

**Untersuchungen zum Aufbau der Stroma-Biomatrix  
cornealer Zellkulturmodelle für  
In-vitro-Arzneistoffabsorptionsuntersuchungen  
und zur Geweberekonstruktion**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades  
einer Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von Gesa Maria Grobe  
aus Wolfenbüttel

1. Referent:	PD Dr. Stephan Reichl
2. Referentin:	Professorin Dr. Christel Müller-Goymann
eingereicht am:	11.08.2014
mündliche Prüfung (Disputation) am:	23.02.2015

Druckjahr 2015

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## **Publikationen**

Grobe GM, Reichl S. 2011; Examining the Suitability of Riboflavin/UVA-Treatment for Strengthening the Stromal Bioequivalent of a Human Cornea Construct. *Cur Eye Res* 36(3): 217-231.

Grobe GM, Reichl S. 2013; Characterization of Vitamin C-Induced Cell Sheets Formed from Primary and Immortalized Human Corneal Stromal Cells for Tissue Engineering Applications. *Cells Tissues Organs* 197: 283-297.

## **Tagungsbeiträge**

Grobe GM, Reichl S. 2008; Einfluss von Riboflavin und UVA-Strahlung auf die Zellviabilität und die viskoelastischen Eigenschaften des Stromaäquivalentes eines humanen Korneakonstruktes für Arzneistoffabsorptionsuntersuchungen. 106. DOG-Kongress, Berlin.

Grobe GM, Reichl S. 2012; Stimulation of Extracellular Matrix Synthesis in Human Corneal Keratocytes for Tissue Engineering Applications. *Strategies in Tissue Engineering*, 3<sup>rd</sup> International Conference, Würzburg.

Grobe GM, Reichl S. 2012; Characterization of Vitamin C-Induced Cell Sheets Formed from Primary and Immortalized Human Corneal Stromal Cells for Tissue Engineering Applications. DPhG-Doktorandentagung, Weimar.

### **Posterbeiträge**

Grobe G, Hahne M, Reichl S. 2008; First Steps towards the Prevalidation of Artificial Human Cornea Models for Studying Transcorneal Drug Absorption In Vitro and Safety Assessment of Cosmetics and Ophthalmologics. 6<sup>th</sup> World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Barcelona.

Grobe GM, Reichl S. 2008; Riboflavin/UVA-Behandlung des Stromaäquivalentes eines humanen Korneakonstruktes für In-vitro-Arzneistoffabsorptionsuntersuchungen. DPhG-Jahrestagung, Bonn.

Grobe GM, Reichl S. 2009; Analyzing Cell Viability of the Stromal Bioequivalent of a Human Cornea Construct for Drug Absorption Studies after Riboflavin/UVA-Treatment. ARVO Annual Meeting, Fort Lauderdale.

Grobe GM, Reichl S. 2009; Analyzing Cell Viability of Immortalized Human Corneal Keratocytes after Riboflavin/UVA-Treatment. DPhG-Jahrestagung, Jena.

Grobe GM, Reichl S. 2010; Riboflavin/UVA-Treatment of Human Corneal Keratocytes Leads to Dose Dependent Cell Death via Apoptosis or Necrosis. 7<sup>th</sup> World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Malta.

Grobe GM, Reichl S. 2010; Examining the Suitability of Riboflavin/UVA-Treatment for Tissue Engineering Applications. ARVO Annual Meeting, Fort Lauderdale.

Grobe GM, Reichl S. 2010; Examining the Suitability of Riboflavin/UVA-Treatment for Tissue Engineering Applications. DPhG-Jahrestagung, Braunschweig.

Grobe GM, Reichl S. 2011; Comparison of Vitamin C Induced Collagen Synthesis in Primary and Immortalized Human Corneal Keratocytes. ARVO Annual Meeting, Fort Lauderdale.

Grobe GM, Reichl S. 2011; Vitamin C Induced Collagen Synthesis in Primary and Immortalized Human Corneal Keratocytes. 109. DOG-Kongress, Berlin.

Grobe GM, Reichl S. 2012; Vitamin C Induced Collagen Synthesis in Primary and Immortalized Human Corneal Keratocytes. 8<sup>th</sup> World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Istanbul.

Grobe GM, Reichl S. 2012; Stimulation of Extracellular Matrix Synthesis in Human Corneal Keratocytes for Tissue Engineering Applications. 110. DOG-Kongress, Berlin.

Für meine Eltern  
und  
meine Schwestern

In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern,  
die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben,  
während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.

(Sir Isaac Newton)

### **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Anleitung von Herrn PD Dr. Stephan Reichl am Institut für Pharmazeutische Technologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.

Herrn PD Dr. Stephan Reichl

danke ich ganz herzlich für die Zuweisung des interessanten Themas und die Unterstützung bei dessen Bearbeitung. Die ständige Diskussionsbereitschaft und jederzeit nette persönliche Betreuung werden mir stets in guter Erinnerung bleiben.

Frau Prof. Dr. Christel C. Müller-Goymann danke ich für die fruchtbaren Diskussionen im Rahmen der Gruppenbesprechungen sowie für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Weiterhin danken möchte ich Dr. Michaela Zorn-Kruppa, Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie des Universitätsklinikums Eppendorf Hamburg, und Dr. Jürgen Bednarz, Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde des Universitätsklinikums Eppendorf Hamburg, für die freundliche Überlassung der humanen cornealen Keratozyten-Zelllinie bzw. der humanen cornealen Endothelzelllinie, der Augenklinik der Medizinischen Hochschule Hannover für die Unterstützung mit humanen skleralen Ringen sowie dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für die finanzielle Förderung der Untersuchungen am Cornea-Modell für In-vitro-Arzneistoffabsorptionsuntersuchungen unter dem Förderkennzeichen 0313913D.

Des Weiteren danke ich allen technischen und wissenschaftlichen Mitarbeitern des Instituts für die freundliche Arbeitsatmosphäre, die gute Zusammenarbeit und die hilfreiche Unterstützung, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt dabei Ulrike Kruse, Dagmar Hahne und Lucia Albrecht für die großartige Unterstützung und ihren hohen Einsatz im Zellkulturlabor, Christian Weber für die Einführung in die



## *DANKSAGUNG*

---

Zellkulturtechniken und den fachlichen Rat, Matthias Hahne für die konstruktive Zusammenarbeit im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten Verbundprojektes und im Speziellen Jessica Verstraelen und Anne Dolberg für die außerordentlich gute Zusammenarbeit im Zellkulturlabor, die zahlreichen anregenden fachlichen Diskussionen und auch für die heiteren Momente im Labor.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung während der gesamten Promotionszeit und für den motivierenden Rückhalt während der Anfertigung der vorliegenden Dissertationsschrift.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Problemstellung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Allgemeiner Teil</b>	<b>4</b>
2.1	Das Auge	4
2.1.1	Die äußere Augenhaut	6
2.1.2	Die mittlere Augenhaut	7
2.1.3	Die innere Augenhaut	8
2.2	Die Cornea	9
2.2.1	Das Epithel	10
2.2.2	Die Bowman-Membran	11
2.2.3	Das Stroma	11
2.2.4	Die Descemet-Membran	15
2.2.5	Das Endothel	15
2.3	Ausgewählte Erkrankungen des Auges und deren Therapieoptionen	16
2.3.1	Erkrankungen des Auges mit vorwiegend medikamentöser Therapie	16
2.3.1.1	Corneale Absorption von Arzneistoffen	17
2.3.1.2	Das Glaukom	19
2.3.1.3	Entzündliche und infektiöse Erkrankungen des Auges	21
2.3.2	Erkrankungen der okularen Oberfläche mit operativen Therapieoptionen	24
2.3.2.1	Der Keratokonus	26
2.3.2.2	Das Trachom	28
2.3.2.3	Endothelinsuffizienz	29
2.3.2.4	Verbrennungen und Verätzungen	30
2.3.2.5	Limbale Stammzellinsuffizienz	31
2.4	Zellkulturen und Zellkulturmodelle	31
2.4.1	Corneale Epithelzellen	33

2.4.2	Corneale Stromazellen	35
2.4.3	Corneale Endothelzellen	37
2.4.4	Organotypische Zellkulturmodelle der Cornea für In-vitro-Anwendungen	39
2.4.5	Zellkulturen in der regenerativen Ophthalmologie	43
<b>2.5</b>	<b>Einsatz zellulärer Assays zur Untersuchung des Status von Zellkulturen</b>	<b>48</b>
2.5.1	Zellviabilität	49
2.5.2	Zelltod durch Apoptose	50
2.5.3	Zelltod durch Nekrose	53
2.5.4	Zellassays	54
2.5.4.1	Viabilitätsassays	54
2.5.4.2	Apoptoseassays	58
2.5.4.3	Zytotoxizitätsassays	61
2.5.4.4	Apoptose-Nekrose-Fluoreszenzfärbung	64
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>66</b>
<b>3.1</b>	<b>Material</b>	<b>66</b>
3.1.1	Biologisches Material	66
<b>3.2</b>	<b>Allgemeine Methoden der Zellkultivierung</b>	<b>66</b>
3.2.1	Zellkulturen	66
3.2.2	Corneale Zellkulturen	67
3.2.2.1	Immortalisierte humane corneale Epithelzellen - HCE-T	67
3.2.2.2	Immortalisierte humane corneale Keratozyten - HCK	67
3.2.2.3	Immortalisierte humane corneale Endothelzellen - HENC	68
3.2.2.4	Primäre humane Fibroblasten - HuFib	69
3.2.3	Humane dermale Fibroblasten - HDF	69
3.2.4	Kultivierung und Subkultivierung	70
3.2.5	Kryokonservierung	70
3.2.6	Prüfung auf Mykoplasmenfreiheit	71

3.2.7	Mikroskopie	71
3.2.8	Bradford-Bestimmung	71
<b>3.3</b>	<b>Studienbezogene Methoden</b>	<b>72</b>
3.3.1	Studienaufbau zur Verfestigung der Biomatrix eines Cornea-Konstruktes für In-vitro-Arzneistoffabsorptionsuntersuchungen	72
3.3.1.1	Kultivierung und Charakterisierung des organotypischen Cornea- Konstruktes	73
3.3.1.1.1	Präparation von Collagen aus Rattenschwanzsehnen	74
3.3.1.1.2	Aufbau des organotypischen Cornea-Konstruktes	75
3.3.1.1.3	Variation des Aufbaus des organotypischen Cornea- Konstruktes	77
3.3.1.1.4	Histologische Charakterisierung	78
3.3.1.2	Untersuchungen an Stromabioäquivalenten	79
3.3.1.2.1	Kultivierung der Stromabioäquivalente	80
3.3.1.2.2	Riboflavin/UVA-Behandlung von Stromabioäquivalenten	80
3.3.1.2.3	Viabilitätsmessungen an Stromabioäquivalenten	81
3.3.1.2.4	Rheologische Untersuchung der Stromabioäquivalente	83
3.3.1.2.5	Gelelektrophoretische Untersuchung der Stroma- bioäquivalente	83
3.3.1.3	Untersuchungen an Monolayerkulturen	85
3.3.1.3.1	Kultivierung der Monolayerkulturen	85
3.3.1.3.2	Riboflavin/UVA-Behandlung der Monolayerkulturen	85
3.3.1.3.3	Mikroskopische Charakterisierung	86
3.3.1.3.4	Viabilitätsmessung an Monolayerkulturen	86
3.3.1.3.5	Apoptoseassays	88
3.3.1.3.6	Zytotoxizitätsassay	89
3.3.1.3.7	Apoptose-Nekrose-Fluoreszenzfärbung	89

3.3.2	Studienaufbau zur Stimulation der Synthese extrazellulärer Matrix in stromalen Zellen	90
3.3.2.1	Kultivierung der stromalen Zellen	91
3.3.2.2	Proliferationsuntersuchung	92
3.3.2.3	Bestimmung der Zellviabilität	93
3.3.2.4	Bestimmung des Collagengehalts	94
3.3.2.5	Bestimmung des Glykosaminoglykangehalts	95
3.3.2.6	Gelelektrophoretische Untersuchung	95
3.3.2.7	Western Blot	97
3.3.2.8	Immunfluoreszenz	97
3.3.2.9	Lichttransmission	99
3.3.2.10	Rasterelektronenmikroskopie	99
3.3.2.11	Materialprüfung	100
3.3.2.12	Ergänzende Untersuchungen an humanen dermalen Fibroblasten	101
3.3.2.12.1	Langzeitkultivierung von humanen dermalen Fibroblasten	101
3.3.2.12.2	Lichttransmission	101
3.3.2.12.3	Rasterelektronenmikroskopie	101
3.3.2.12.4	Materialprüfung	102
<b>3.4</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>102</b>
<b>4</b>	<b>Versuchsergebnisse und Diskussion</b>	<b>103</b>
<b>4.1</b>	<b>Studie zur Verfestigung der Biomatrix eines Cornea-Konstruktes für In-vitro-Arzneistoffabsorptionsuntersuchungen</b>	<b>103</b>
4.1.1	Kultivierung der cornealen Zellen	105
4.1.1.1	Immortalisierte humane corneale Epithelzellen – HCE-T	105
4.1.1.2	Immortalisierte humane corneale Keratozyten – HCK	105
4.1.1.3	Immortalisierte humane corneale Endothelzellen – HENC	108

4.1.1.4	Zusammenfassende Diskussion zur Kultivierung der humanen cornealen Zellen	108
4.1.2	Aufbau des Cornea-Konstruktes	111
4.1.2.1	Konstruktaufbau unter Verwendung der HCK-Zelllinie	113
4.1.2.2	Variation des Konstruktaufbaus	114
4.1.2.3	Miniaturisierung der HCC	115
4.1.2.4	Zusammenfassende Diskussion zum Aufbau des Cornea-Konstruktes	118
4.1.3	Untersuchungen an Stromabioäquivalenten	119
4.1.3.1	Viabilitätsmessungen	120
4.1.3.2	Rheologische Untersuchung	124
4.1.3.3	Gelelektrophoretische Untersuchung	127
4.1.3.4	Zusammenfassende Diskussion zu Untersuchungen an Stromabioäquivalenten	128
4.1.4	Untersuchungen an Monolayerkulturen	131
4.1.4.1	Mikroskopische Charakterisierung	133
4.1.4.2	Viabilitätsmessung	133
4.1.4.3	Apoptoseassays	135
4.1.4.4	Zytotoxizitätsassay	138
4.1.4.5	Apoptose-Nekrose-Fluoreszenzfärbung	141
4.1.4.6	Zusammenfassende Diskussion zu Untersuchungen an Monolayerkulturen	144
<b>4.2</b>	<b>Studie zur Stimulation der Synthese extrazellulärer Matrix in stromalen Zellen</b>	<b>149</b>
4.2.1	Langzeitkultivierung von stromalen Zellen	150
4.2.2	Zeitabhängige Untersuchungen an Langzeitkulturen stromaler Zellen	151
4.2.2.1	Proliferationsuntersuchung	151
4.2.2.2	Viabilitätsmessung	153

4.2.2.3	Collagengehalt	153
4.2.2.4	Glykosaminoglykangehalt	157
4.2.2.5	Zusammenfassende Diskussion zu zeitabhängigen Untersuchungen an Langzeitkulturen stromaler Zellen	159
4.2.3	Untersuchungen zum Nachweis von Collagentypen	163
4.2.3.1	Gelelektrophoretische Untersuchung	163
4.2.3.2	Western Blot	165
4.2.3.3	Immunfluoreszenz	167
4.2.3.4	Zusammenfassende Diskussion zum Nachweis von Collagentypen	169
4.2.4	Untersuchungen an Zellsheets	171
4.2.4.1	Lichttransmission	171
4.2.4.2	Rasterelektronenmikroskopie	172
4.2.4.3	Materialprüfung	173
4.2.4.4	Ergänzende Untersuchungen an humanen dermalen Fibroblasten	177
4.2.4.4.1	Lichttransmission	178
4.2.4.4.2	Rasterelektronenmikroskopie	178
4.2.4.4.3	Materialprüfung	179
4.2.4.5	Zusammenfassende Diskussion zu Untersuchungen an Zellsheets	179
<b>5</b>	<b>Abschlussdiskussion</b>	<b>186</b>
<b>5.1</b>	<b>Rekonstruktion des Stromas für In-vitro-Arzneistoffabsorptionsuntersuchungen</b>	<b>186</b>
5.1.1	Aufbau des Cornea-Konstruktes für In-vitro-Arzneistoffabsorptionsuntersuchungen	188
5.1.2	Anwendung der Riboflavin/UVA-Methode an Stromabioäquivalenten	190

5.1.3	Anwendung der Riboflavin/UVA-Methode an Monolayerkulturen	191
5.1.4	Fazit zur Anwendung der Riboflavin/UVA-Methode	193
<b>5.2</b>	<b>Rekonstruktion des Stromas als Gewebeersatz</b>	<b>194</b>
5.2.1	Charakterisierung der Langzeitkulturen	197
5.2.2	Nachweis von exprimierten Collagentypen	201
5.2.3	Charakterisierung der Zellsheets	203
5.2.4	Fazit zur Generierung von Zellsheets aus humanen cornealen stromalen Zellen	206
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>208</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>213</b>



# 1 Einleitung und Problemstellung

Corneale Zellkulturmodelle haben in den letzten Jahren sowohl für Fragestellungen der Bioverfügbarkeit von Ophthalmika als auch in der regenerativen Augenheilkunde an Bedeutung gewonnen.

Die Hornhaut des Auges (Cornea) stellt die Hauptbarriere für topisch am Auge applizierte Arzneistoffe dar. Deshalb sind bei der Entwicklung neuer ophthalmologischer Wirkstoffe oder Arzneiformen zur Anwendung am Auge Untersuchungen zur transcornealen Arzneistoffaufnahme ins Auge unabdingbar. Es werden dafür zumeist Untersuchungen an exzidierten tierischen Hornhäuten durchgeführt. Allerdings ist die Verwendung von tierischem Corneagewebe mit erheblichen Nachteilen behaftet, wie den ethischen Bedenken gegenüber dem Töten von Tieren zu Versuchszwecken, der fraglichen Übertragbarkeit der ermittelten Ergebnisse auf den Menschen und der mangelnden Verfügbarkeit homogenen Gewebes. Als Alternative wurde in einer vorangegangenen Dissertationsarbeit an diesem Institut ein organotypisches humanes Cornea-Konstrukt für In-vitro-Arzneistoffabsorptionsuntersuchungen entwickelt. Der Aufbau dieses Modells erfolgte schrittweise unter Verwendung der drei cornealen Zelltypen und einer Collagenmatrix als Wachstumssubstrat. In Weiterentwicklung dieses Cornea-Konstruktes sollten die nativen cornealen Fibroblasten durch eine immortalisierte Keratozytenzelllinie ersetzt werden, um die Standardisierbarkeit und Reproduzierbarkeit des Konstruktes zu erhöhen. Des Weiteren sollte die Festigkeit des Cornea-Konstruktes durch eine Quervernetzung der Collagenfibrillen der Gelmatrix erhöht werden, um die Handhabbarkeit der Konstrukte sowie ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischen Belastungen, denen sie bei der Durchführung der Permeationsexperimente ausgesetzt sind, zu verbessern. Dafür sollte die Eignung der in der Ophthalmologie eingesetzten Riboflavin/UVA-Methode untersucht werden. Bei Einsatz dieses Verfahrens war, neben der Verbesserung der biomechanischen Festigkeit des Konstruktes, die Zellverträglichkeit dieser Methode ein entscheidendes Kriterium.

Pathologische Funktionsstörungen der Augenhornhaut führen häufig zu einer Abnahme des Sehvermögens bis hin zum vollständigen Verlust der Sehfähigkeit. Vielfach sind die Erkrankungen durch eine medikamentöse Therapie nicht behandelbar, sodass chirurgische Eingriffe erforderlich werden. Bei tiefergreifenden Störungen der Cornea ist eine Transplantation einer humanen Spenderhornhaut indiziert. Da geeignete humane Spendercorneae nur in begrenztem Maße zur Verfügung stehen, sind Alternativen zu diesem biologischen Material Gegenstand zahlreicher Forschungen. Dabei erweist sich insbesondere die In-vitro-Rekonstruktion eines cornealen Stromabioäquivalentes, das die physiologischen Funktionen erfüllt, als äußerst schwierig, sodass keines der bisherigen Forschungsergebnisse eine Alternative zur Transplantation von humanem Spendergewebe für eine routinemäßige klinische Anwendung darstellt. Die Generierung von cornealen stromalen Zellsheets durch die Stimulation der Synthese extrazellulärer Matrix in Zellkulturen stellt einen vielversprechenden Ansatz für die Rekonstruktion des cornealen Stromagewebes dar. Allerdings liegen derzeit weder systematische, zeitabhängige Untersuchungen bezüglich der Sekretion von extrazellulärer Matrix der cornealen Zellkulturen noch eine eingehende Charakterisierung wesentlicher biophysikalischer Eigenschaften cornealer stromaler Zellsheets vor, die die Grundlage für ihren möglichen Einsatz bei der Entwicklung eines in vitro erzeugten cornealen Gewebeersatzes darstellen.

Ziele der vorliegenden Arbeit waren daher zum einen:

- der Aufbau des Cornea-Konstruktes für Arzneistoffabsorptionsuntersuchungen ausschließlich aus immortalisierten humanen cornealen Zelllinien unter Adaption des Kultivierungsprotokolls an die Verwendung einer immortalisierten Keratozytenzelllinie,
- die Variation des Kultivierungsprotokolls hinsichtlich der Anwendbarkeit einer Methode zur Verfestigung der Collagenmatrix des Konstruktes,
- die Applikation der Riboflavin/UVA-Methode auf den stromalen Anteil des Cornea-Konstruktes,
- die Untersuchung des Verfestigungseffektes der Riboflavin/UVA-Methode,

- die Evaluierung des Einflusses der Riboflavin/UVA-Methode auf die Vitalität der stromalen Zellen

und zum anderen:

- die vergleichende Langzeitkultivierung nativer und immortalisierter cornealer stromaler Zellen unter Stimulation der Synthese extrazellulärer Matrix,
- die eingehende Betrachtung der Langzeitkulturen hinsichtlich der proliferativen Eigenschaften und der Viabilität der Zellen sowie der Menge an sezernierter extrazellulärer Matrix,
- die Charakterisierung der Zusammensetzung und der inneren Struktur der sezernierten extrazellulären Matrix
- die Evaluierung der optischen Eigenschaften der cornealen stromalen Zellsheets sowie der zeitabhängigen Ausprägung ihrer biomechanischen Festigkeit.

## 2 Allgemeiner Teil

### 2.1 Das Auge

Das Auge (Abbildung 2.1) ist das Sinnesorgan, mit dem wir über Lichtreize unsere Umwelt wahrnehmen können. Dabei zählen die Hornhaut und die Linse als brechende Medien zu den bildentwerfenden Abschnitten des Auges. Der bildaufnehmende Teil ist die Netzhaut. In ihr werden mit Hilfe von Photorezeptoren elektromagnetische Wellen im Bereich von 400-750 nm über photochemische Prozesse in Erregungen umgewandelt, die über den Sehnerv (Nervus opticus) in das primäre Sehzentrum der Großhirnrinde weitergeleitet werden [Thews et al., 1999].

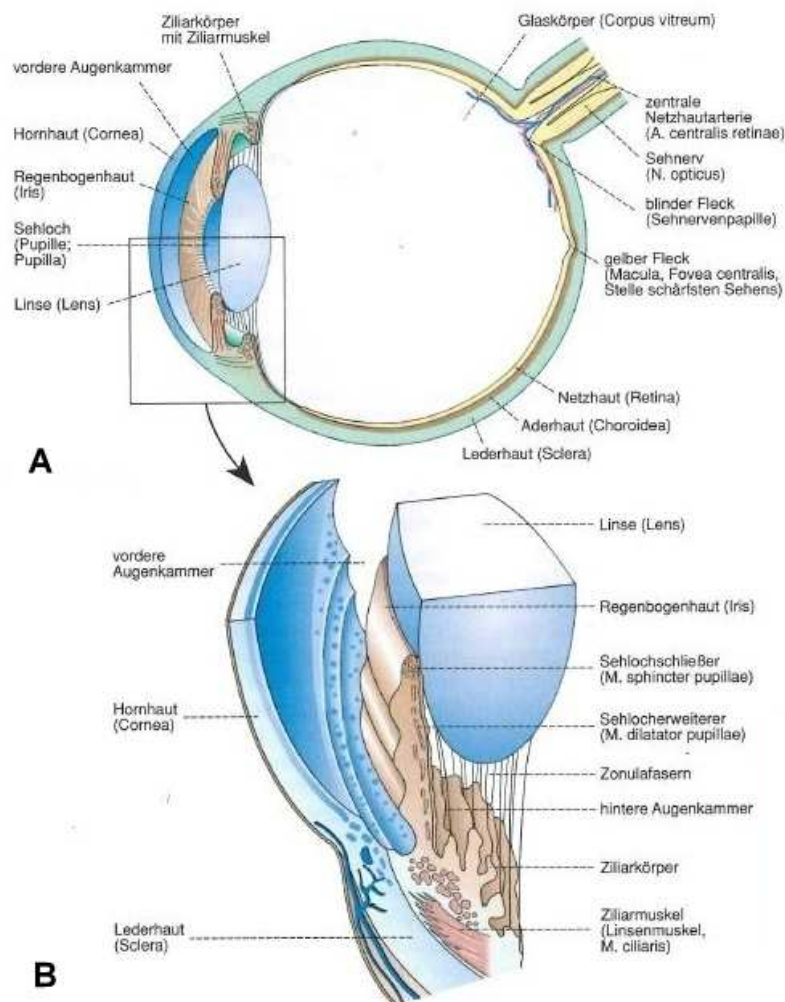


Abbildung 2.1: Schnittbild des Augapfels (A) mit Detaildarstellung von Cornea, Iris und Linse (B) [Speckmann und Wittkowski, 1998].

Der Augapfel (Bulbus oculi) liegt, vor Verletzungen von außen geschützt, in der knöchernen, durch Fett- und Bindegewebe gepolsterten Augenhöhle (Orbita). Weitere Schutzfunktion vor dem Eindringen von Fremdkörpern oder Stirnschweiß erfüllen die durch eine schalenförmige Bindegewebsplatte versteiften Augenlider, die von der vorderen Lidkante abgehenden Wimpern sowie die den oberen Rand der Orbita markierenden Augenbrauen. In die Bindegewebsplatte der Lider sind Talgdrüsen, sog. Meibom-Drüsen, eingelassen, deren Sekret die Lidränder einfettet. Die Innenwand der Augenlider wird von einem mehrschichtigen, unverhornten Plattenepithel, der Augenbindehaut (Conjunctiva bulbi), ausgekleidet. Die Bindehaut geht über die obere und untere Umschlagfalte auf die Vorderfläche des Bulbus über und bedeckt diesen bis zum Rand der Hornhaut [Thews et al., 1999]. Die Augenlider sorgen außerdem durch den Lidschlag zusammen mit der Tränenflüssigkeit für eine mechanische Reinigung des Bindehautsackes und der Hornhautoberfläche. Neben der Reinigungsfunktion dient der Tränenfilm auch der Befeuchtung der Bulbusoberfläche sowie der Ernährung und Entquellung der Hornhaut. Durch das enthaltene Lysozym hat die Tränenflüssigkeit außerdem eine bakterizide Wirkung [Grehn, 2012]. Weitere Immunkompetenz wird durch das ebenfalls in der Tränenflüssigkeit enthaltene Immunglobulin A vermittelt, das wie auch auf anderen Schleimhautoberflächen vor der Adhärenz von Bakterien schützt [Köhler et al., 2001].

Der Tränenfilm hat eine Gesamtdicke von 7-9  $\mu\text{m}$  und besitzt einen dreischichtigen Aufbau [Barraquer und Rutllan, 1991]. Die äußere Lipidschicht mit einer Dicke von etwa 0,1  $\mu\text{m}$ , die von den Meibom-Drüsen gebildet wird, dient der Erhöhung der Oberflächenspannung und infolgedessen der Unterstützung der Stabilität des Tränenfilms, sodass der Meniskus nicht über den Lidrand fließen kann. Außerdem verzögert er die Evaporation der darunter liegenden, wässrigen Schicht und ermöglicht die Gleitfähigkeit der Augenlider über der Bulbusoberfläche. Die mittlere, etwa 7  $\mu\text{m}$  dicke, wässrige Schicht wird von der am oberen Teil der Orbita gelegenen Tränendrüse (Glandula lacrimalis) und zahlreichen kleineren akzessorischen Tränendrüsen in der oberen und unteren Umschlagfalte der Bindehaut gebildet. Diese wässrige Schicht dient der Sauerstoffversorgung des Hornhautepithels, dem

Abwaschen von Debris und dem Ausgleich von kleinsten Unregelmäßigkeiten der Hornhautoberfläche. Die innere Muzinschicht, die von conjunctivalen Becherzellen sezerniert wird und ca. 0,02-0,05  $\mu\text{m}$  misst, ermöglicht das Anhaften der wässrigen Schicht auf der hydrophoben Bulbusoberfläche [Kanski, 1996; Barraquer und Rutllan, 1991]. Die Tränenflüssigkeit wird durch den Lidschlag zum inneren Lidwinkel transportiert und dort vom unteren und oberen Lidpünktchen aufgenommen. Schließlich gelangt sie über die Tränenkanälchen in den Tränensack und wird von da durch den Tränennasengang in die Nase abgeleitet [Speckmann und Wittkowski, 1998; Grehn, 2012]. Die Beweglichkeit des Augapfels in der Augenhöhle wird über die sechs äußeren, der Willkür unterliegenden Augenmuskeln vermittelt [Paulsen und Waschke, 2010].

### **2.1.1 Die äußere Augenhaut**

Die äußere Augenhaut (Tunica externa oder Tunica fibrosa) ist eine feste, bindegewebige Schutzschicht, die dem Augeninnendruck standhalten muss und die Form des Auges bestimmt [Wachtler, 2005]. Der Augeninnendruck nimmt normalerweise Werte zwischen 10-22 mmHg an, wobei der Durchschnittswert 16 mmHg beträgt [Kunsch und Kunsch, 2005; Kanski, 1996]. Die Tunica externa besteht aus der derben, undurchsichtigen Lederhaut (Sklera) und der durchsichtigen, etwas stärker gekrümmten Hornhaut (Cornea), die wie ein Uhrglas in die Sklera eingelassen ist. Die zwischen ihnen liegende seichte Rinne wird als Limbus cornea bezeichnet [Grehn, 2012]. Die weiße, etwa 1 mm dicke Lederhaut besteht aus nahezu zellfreiem Bindegewebe, das nur wenige Gefäße und Nerven enthält. Sie besitzt einen ähnlichen Aufbau wie die Hornhaut, ist allerdings durch die weniger geordneten Collagenfibrillen und den höheren Wassergehalt undurchsichtig [Wachtler, 2005; Grehn, 2012].

### 2.1.2 Die mittlere Augenhaut

Zur mittleren Augenhaut (Tunica media oder Uvea) gehören die Regenbogenhaut (Iris), der Ziliarkörper (Corpus ciliare) und die Aderhaut (Choroidea). Die sehr gefäßreiche Aderhaut dient der Ernährung umliegender Gebiete, insbesondere der Photorezeptoren der Retina. Außerdem hält sie die Temperatur des Auges konstant, indem sie die beim photochemischen Prozess entstehende Wärme abführt [Grehn, 2012].

Die Iris ist eine runde Gewebsplatte, die mit ihrer Ebene senkrecht zur Längsachse des Auges steht [Speckmann und Wittkowski, 1998]. Im Zentrum der Iris liegt das kreisrunde Sehloch, die Pupille, dessen Weite über zwei vegetative Muskeln der Iris veränderlich ist, um den Lichteinfall in das Auge zu regulieren (Adaption) [Thews et al., 1999; Paulsen und Waschke, 2010]. Die Stelle, an der die Vorderfläche der Irisbasis mit der Sklera unmittelbar vor deren Übergang in die Hornhaut zusammentrifft, wird als Kammerwinkel bezeichnet [Thews et al., 1999]. Der Kammerwinkel, die Irisvorderfläche und die Linsenvorderfläche im Bereich der Pupille sowie die Rückseite der Hornhaut begrenzen die vordere Augenkammer. Die hintere Augenkammer ist wesentlich kleiner als die vordere und wird von der Hinterfläche der Iris, dem Ziliarkörper mit den Zonulafasern, der peripheren Linsenhinterfläche und der Vorderfläche des Glaskörpers umschlossen [Grehn, 2012].

Im vorderen Abschnitt des Auges bildet die Uvea den Ziliarkörper, dessen Epithel in der hinteren Augenkammer das Kammerwasser sezerniert. Das Kammerwasser, das der Ernährung von Linse und Hornhaut dient, fließt von der hinteren Augenkammer zwischen Iris und Linse in die vordere Augenkammer. Es passiert den Kammerwinkel, der aus einem schwammartigen Maschenwerk, dem Trabekelwerk, besteht, und gelangt in den ringförmigen Schlemm-Kanal. Von dort wird das Kammerwasser über Abflusskanälchen in sklerale und conjunctivale, venöse Gefäße abgeleitet [Grehn, 2012].

Der Ziliarkörper enthält den ringförmigen Ziliarmuskel. Dieser reguliert durch seine Entspannung oder Kontraktion, vermittelt über die Zonulafasern, den Krümmungsradius der Linse, die hinter der Pupille in einer Grube des Glaskörpers liegt. Durch die veränderliche Krümmung der bikonvexen, kristallklaren, gefäß- und nervenfreien Linse verändert diese ihre

Brechkraft (Akkommodation), wodurch die Nah- und Ferneinstellung des Auges ermöglicht werden [Thews et al., 1999; Grehn, 2012].

### **2.1.3 Die innere Augenhaut**

Die innere Augenhaut (Tunica interna), die auch als Netzhaut oder Retina bezeichnet wird, besteht aus einem blinden (Pars caeca retinae) und einem sehenden Teil (Pars optica retinae). Die lichtunempfindliche Pars caeca ist ein dünnes, stark pigmentiertes Epithel, das die Rückseite der Iris und des Ziliarkörpers überzieht [Paulsen und Waschke, 2010]. Die Pigmentschicht verhindert Lichtreflexe und -streuungen [Wachtler, 2005]. Gleich hinter dem Ziliarkörper geht das Pigmentepithel in die sehr viel dickere, lichtempfindliche Pars optica über [Paulsen und Waschke, 2010]. Die Pars optica gliedert sich in mehrere Schichten, wobei die äußere, der Aderhaut zugewandte Seite wiederum aus einem lichtunempfindlichen Pigmentepithel besteht. Darunter liegt der eigentlich lichtempfindliche Teil mit den Photorezeptoren und den nachgeschalteten Nervenzellen, deren Fasern sich im Sehnerv fortsetzen [Wachtler, 2005; Speckmann und Wittkowski, 1998]. Bei den Photorezeptoren lassen sich die für das Dämmerungs- und Nachtsehen verantwortlichen Stäbchen und die das Tag- und Farbsehen vermittelnden Zapfen unterscheiden. Im zentralen Bereich der Netzhaut sind überwiegend Zapfen zu finden, während die Stäbchen in der Peripherie vorherrschen [Grehn, 2012]. An der Sehnervenpapille, dem Austrittsort des Sehnervs aus dem Bulbus, befindet sich der sogenannte Blinde Fleck, da an dieser Stelle keine Photorezeptoren vorliegen [Speckmann und Wittkowski, 1998]. Temporal der Papille liegt die gelblich pigmentierte Macula lutea (Gelber Fleck), deren Zentrum eine kleine Vertiefung, die sogenannte Fovea centralis, bildet. Da an dieser Stelle ausschließlich die für das Farbsehen verantwortlichen Zapfen vorliegen, ist dies der Ort des schärfsten Sehens [Grehn, 2012].

Der gallertartige, durchsichtige Glaskörper füllt den Raum des Augeninnern hinter der Linse und stabilisiert durch seinen Quellungsdruck die häutige Konstruktion des Augapfels [Paulsen und Waschke, 2010]. Er besteht zu 99% aus Wasser, gelöstem Hyaluronat und aus feinsten collagenen Fibrillen [Wachtler, 2005].



## 2.2 Die Cornea

Am corneoskleralen Limbus, einer etwa 1,5 mm breiten, ringförmigen, unscharf abgegrenzten Übergangszone, treffen Sklera, Bindehaut und Hornhaut zusammen. Die Hornhautoberfläche ist konvex und leicht ellipsenförmig. Sie misst im vertikalen Durchmesser etwa 10,6 mm und im horizontalen Durchmesser circa 11,6 mm [Barraquer und Rutllan, 1991]. Die zentrale Hornhautdicke beträgt circa 550  $\mu\text{m}$ , während der periphere Bereich mit etwa 700  $\mu\text{m}$  Dicke stärker ausgeprägt ist [Grehn, 2012]. Die Cornea ist von derber Konsistenz und stellt die vorderste optische Linse des Auges dar. Ihre Brechkraft ist im Gegensatz zu der der Linse nicht veränderlich. Dennoch leistet sie mit 43 dpt etwa zwei Drittel der Gesamtrefraktion des Auges [Barraquer und Rutllan, 1991; Grehn, 2012]. Die Durchsichtigkeit des Gewebes wird durch die regelmäßige Anordnung der collagenen Fasern, die in eine glykoproteinreiche Kittsubstanz eingelagert sind, und die Abwesenheit von Blutgefäßen ermöglicht. Daher erfolgt die Ernährung der Hornhaut durch Diffusion aus dem Kammerwasser, der Tränenflüssigkeit und den arteriellen Gefäßen am Hornhautrand [Thews et al., 1999].

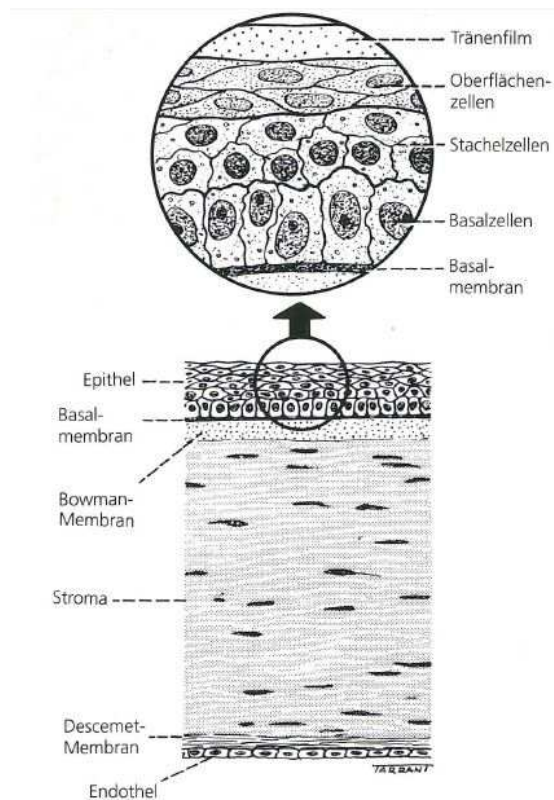


Abbildung 2.2: Anatomie der Hornhaut [Kanski, 1996].

Anatomisch betrachtet besteht die Cornea aus fünf Schichten: dem äußeren Epithel, der Bowman-Membran, dem Stroma, der Descemet-Membran und dem innen liegenden Endothel (Abbildung 2.2).

### 2.2.1 Das Epithel

Das corneale Epithel ist ein etwa 50 µm dickes, unverhorntes Plattenepithel und besteht aus 5-6 Zellschichten gebildet von drei verschiedenen Zellarten [Ruberti und Zieske, 2008; Kanski, 1996, Thews et al., 1999]. Die untere Schicht, die Basalzellschicht, wird von einer einzelnen Lage zylindrischer, palisadenförmig angeordneter Zellen gebildet, die über Hemidesmosomen mit der epithelialen Basalmembran verankert sind. Die Basalmembran wird von den epithelialen Zellen gebildet und verschmilzt am Limbus mit der Basalmembran der Bindehaut. Sie enthält Laminin und Collagen Typ IV sowie Ankerfibrillen, die zusammen mit den Hemidesmosomen die feste Adhäsion des Epithels auf dem Hornhautstroma gewährleisten [Kanski, 1996; Ruberti und Zieske, 2008; Barraquer und Rutllan, 1991]. Die Zellen der mittleren Flügelzellschicht sind in 2-3 Schichten angeordnet und tragen dünne, stachelartige Fortsätze. Sie sind über Desmosomen mit den Basalzellen verbunden. Die Oberflächenzellen sind stark abgeflacht und bilden zwei Zellschichten aus. Die oberste Zellschicht trägt an der freien Oberfläche zahlreiche Mikrovilli, denen der präcorneale Tränenfilm anhaftet [Barraquer und Rutllan, 1991; Kanski, 1996]. Die Oberflächenzellen sind durch enge Zellkontakte (tight junctions) untereinander verbunden und stellen dadurch eine wichtige Permeationsbarriere für chemische Substanzen sowie Antigene dar [Barraquer und Rutllan, 1991; Ruberti und Zieske, 2008].

Lediglich die Basalzellen des Epithels besitzen mitotische Aktivität. Durch die Zellteilung wandern die Zellen in apikaler Richtung, um sich zunächst zu Flügelzellen und später zu Oberflächenzellen zu differenzieren. Die obersten Zellen schilfern nach einer Lebensspanne weniger Tage in den Tränenfilm ab. Dieser Regenerationsprozess des cornealen Epithels benötigt etwa 7-14 Tage [Raviv, 2010; Kanski, 1996].

### **2.2.2 Die Bowman-Membran**

Die Bowman-Membran ist ein azelluläres Band aus multiplen, dicht verwobenen Collagenmikrofilamenten, umgeben von einer Proteingrundsubstanz, das sich zwischen dem cornealen Epithel und dem Stroma befindet [Barraquer und Rutllan, 1991]. In Abgrenzung zum cornealen Stroma haben die Collagenfibrillen der Bowman-Membran eine zufällige Anordnung und einen kleineren Durchmesser. Die physiologische Funktion der Bowman-Membran ist bisher unbekannt. Möglicherweise dient sie der Strukturhaltung des Epithels, bewahrt die optische Stabilität oder sorgt für eine physikalische Abgrenzung des Mikromilieus von Epithel und Stroma [Raviv, 2010]. Die Bowman-Membran regeneriert nach Verletzungen nicht [Kanski, 1996].

### **2.2.3 Das Stroma**

Die Kernattribute der Cornea, Transparenz und mechanische Festigkeit, die zum einen die Lichttransmission und zum anderen den Widerstand gegen den intraokularen Druck erlauben, werden durch die äußerst regelmäßige Struktur der extrazellulären Matrix des Stromas vermittelt, insbesondere durch die die Lichtstreuung minimierende, gitterartige Anordnung der Collagenfibrillen [Maurice, 1957; Goldman et al., 1968; Benedek, 1971; Ethier et al., 2004]. Dabei tragen insbesondere Collagen V und Proteoglykane durch Regulation des Fibrillendurchmessers und -abstands zur Transparenz des Gewebes bei [Doane et al., 1992; Scott, 1991; Rada et al., 1993; Hassell und Birk, 2010]. Weiterhin ist das Endothel maßgeblich an der Transparenz der Stromamatrix beteiligt, indem es den Quellungszustand und damit den Abstand der Collagenfibrillen zueinander konstant hält [Barraquer und Rutllan, 1991]. Darüber hinaus bedingen intrazelluläre corneale Kristalline, zu denen z.B. die Aldehyddehydrogenase und die Transketolase zählen, die zelluläre Transparenz der Keratozyten [Jester et al., 1999; Hassell und Birk, 2010]. Auf die Komponenten des cornealen Stromas und deren strukturelle Anordnung wird im Folgenden detailliert eingegangen.

Das Stroma erstreckt sich über ca. 90% der Hornhautdicke und besteht selbst zu 75% aus Wasser, zu 3-10% aus stromalen Zellen, den Keratozyten, und aus extrazellulärer Matrix [Ruberti und Zieske, 2008; Maurice, 1957]. Die Keratozyten sind von langgestreckter und flacher Struktur und tragen zahlreiche Filopodien, die sie via gap junctions mit benachbarten Keratozyten verbinden, um so ein Synzytium zu formen [Raviv, 2010]. Diese Zellen sind für die Sekretion der sie umgebenden extrazellulären Matrix verantwortlich und organisieren die Formation von Collagen zu Fibrillen, Bündeln und Lamellen [Raviv, 2010; Birk und Trelstad, 1984].

Wesentliche Bestandteile der extrazellulären Matrix sind verschiedene Collagentypen und Proteoglykane. Übereinstimmend wird beschrieben, dass Collagen Typ I dabei der vorherrschende Typ ist. Allerdings variieren die quantitativen Angaben sowohl zum Vorkommen des Typs I als auch zur Präsenz anderer Collagentypen im Stroma der humanen Cornea. Radda et al. beschreiben eine Zusammensetzung der cornealen Collagene von 85% Typ I, weniger als 10% Typ III und 5% Typ V [1982]. Diese qualitative Zusammensetzung von Collagentypen wird durch Barraquer und Rutllan unterstützt [1991]. Grehn postuliert für das Hornhautstroma eine bindegewebige Zusammensetzung aus Collagen Typ I und III [2012]. Demgegenüber gibt Meek für das corneale Stroma eine Zusammensetzung von 58% Typ I, 24% Typ VI, 15% Typ V und geringeren Anteilen der Typen XII und XIV an [2008]. Gemäß Raviv ist bei den fibrillären cornealen Collagenen, neben dem dominierenden Typ I, der Typ V mit 15-20% vertreten [2010]. Griffith et al. beschreiben für das corneale Stroma eine Komposition der Collagene von 70% Typ I, 20% Typ V und geringeren Mengen anderer Collagentypen [2002a]. Dyrland et al. haben im humanen cornealen Stroma neben Collagen Typ I, die Typen VI, V und XII sowie in geringen Mengen Typ III nachgewiesen [2012].

Strukturell betrachtet interagiert Collagen Typ I mit Collagen Typ V zu Heterofibrillen mit einem einheitlichen monodispersen Fibrillendurchmesser von durchschnittlich 31 nm [Birk et al., 1990; Meek et al., 2003]. Die Collagenfibrillen des Stromas verlaufen parallel zueinander und besitzen einen einheitlichen Abstand [Barraquer und Rutllan, 1991]. Sie bilden dabei

1-2  $\mu\text{m}$  dicke Schichten (Lamellae) aus. 300-500 solcher Lamellae sind im Stroma übereinander gelagert, wobei die Orientierung der Collagenfibrillen in benachbarten Lamellen zueinander in einem Winkel von 0-90° versetzt ist [Ruberti und Zieske, 2008; Meek und Boote, 2004]. Durch diese Anordnung entsteht eine sehr regelmäßige Gitterstruktur, die strikt parallel zur Augenoberfläche verläuft und somit sowohl die Transparenz als auch die enorme mechanische Festigkeit dieses Gewebes ermöglicht [Maurice, 1957; Benedek, 1971; Goldman et al., 1968; Ethier et al., 2004].

Neben Collagen stellen Proteoglykane eine wichtige Komponente der extrazellulären Matrix des Stromas dar. Sie regulieren die Collagenfibrillogenese und sorgen für einen regelmäßigen Abstand der Collagenstränge zueinander, indem sie sich in die Zwischenräume einlagern. Damit leisten sie einen wichtigen Beitrag zur Transparenz des Gewebes [Rada et al., 1993; Iozzo, 1998; Hassel und Birk, 2010]. Die Bindung der Proteoglykane an die Collagenfibrillen erfolgt dabei über spezifische Bindestellen [Scott und Haigh, 1988; Scott, 1991]. Strukturell betrachtet bestehen Proteoglykane aus einem Kernprotein, an das bis zu 100 Glykosaminoglykan-Ketten kovalent gebunden sind. Bei diesen handelt es sich um lineare, polyanionische Polysaccharide aus sich wiederholenden Disaccharid-Einheiten [Kjellén und Lindahl, 1991]. Je nach vorkommenden Disaccharid-Einheiten können die Glykosaminoglykan-Ketten in drei Typen unterschieden werden, die Keratansulfat-, die Heparansulfat- und die Chondroitinsulfat/Dermatansulfat-Seitenketten [Hassel und Birk, 2010]. Die Disaccharid-Einheiten bestehen stets aus einem Aminosucker (N-Acetylgalaktosamin, Glucosamin oder N-Acetylglucosamin), kombiniert mit einer Uronsäure (Glucuronsäure oder Iduronsäure) oder Galaktose (im Falle von Keratansulfat) [Brandenburger und Bajorat, 2006].

In der humanen Cornea findet man vier Proteoglykane (Decorin, Lumican, Keratocan und Mimecan), die zur Gruppe der sogenannten kleinen, leucinreichen Proteoglykane gehören [Hassel und Birk, 2010]. Ihre Kernproteine haben eine Größe zwischen 35 kDa und 40 kDa. Decorin trägt eine einzelne 55-60 kDa große Chondroitinsulfat/Dermatansulfat-Kette, während Lumican, Keratocan und Mimecan 2-5 Keratansulfat-Ketten von jeweils 10-15 kDa

tragen, sodass diese Proteoglykane insgesamt klein genug sind, um in die Zwischenräume der Collagenfibrillen zu passen und deren Abstand zu regulieren [Iozzo, 1998; Hassel und Birk, 2010].

Die cornealen stromalen Zellen können in verschiedenen Phänotypen auftreten. In der adulten, ungeschädigten Cornea ist der ruhende, synthetisch wenig aktive Keratozyten-Phänotyp zu finden. Bei cornealen Verletzungen, die die epitheliale Basalmembran nicht in Mitleidenschaft ziehen, sodass die Schädigung auf das Epithel beschränkt bleibt, kommt es zur Apoptose von stromalen Keratozyten unterhalb des geschädigten Bereichs. Nach kurzer Zeit werden diese Zellen durch die mitotische Aktivität benachbarter Keratozyten ersetzt. Dieser Prozess schützt die Cornea vor weiteren Entzündungsprozessen und damit verbundenen Einschränkungen der Gewebetransparenz. Nach tiefergreifenden Traumata oder Infektionen, die die epitheliale Basalmembran beeinträchtigen, werden nach dem initialen Apoptoseprozess verbleibende Keratozyten aus dem näheren Verletzungsareal zu Reparatur-Fibroblasten aktiviert, die sodann zur Wunde migrieren. An dieser Aktivierung sind aus dem Epithel stammende Wachstumsfaktoren, wie z.B. Interleukin-1 $\alpha$ , und Cytokine beteiligt. Die Fibroblasten sorgen für die Remodellierung des Gewebes, indem sie sowohl neue extrazelluläre Matrix (ECM) sezernieren als auch Enzyme, sog. Matrixmetalloproteinasen, bilden, die vorhandene extrazelluläre Strukturen degradieren. Die Zusammensetzung der neu gebildeten ECM und auch deren ungeordnete Deposition resultieren in einer Opazität des Reparaturgewebes. Eine weitere Subpopulation der cornealen stromalen Zellen stellen die Myofibroblasten dar, in die einige Fibroblasten nach Stimulierung mit dem Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) epithelialen Ursprungs differenzieren können. Sie sind von größerer Erscheinung und zeichnen sich durch die Synthese von  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA) aus. Dadurch sorgen sie neben der Deposition und Reorganisation der extrazellulären Matrix für die Kontraktion der Wundränder. Allerdings geht die Aktivität der Myofibroblasten mit einer deutlichen Trübung des cornealen Gewebes einher. Der Fibroblasten- und Myofibroblasten-Phänotyp können ineinander übergehen. Nach mehreren Monaten nehmen die Reparatur-Phänotypen wieder

das morphologische Erscheinungsbild von Keratozyten an. Allerdings zeigt ihre Proteinexpression, dass die Umwandlung zum ruhenden Phänotyp nicht vollständig reversibel verläuft [West-Mays und Dwivedi, 2006; Raviv, 2010; Fini, 1999].

#### **2.2.4 Die Descemet-Membran**

Die Descemet-Membran ist eine homogene, zellfreie Schicht, der das corneale Endothel aufsitzt und dieses vom Stroma abtrennt [Wachtler, 2005; Raviv, 2010]. Die Bestandteile dieser Membran, u.a. Fibrillen von Collagen Typ IV und VIII, die ein Gitterwerk ausbilden, sowie Laminin und Fibronectin, werden von den Endothelzellen sezerniert [Raviv, 2010; Grehn, 2012; Kanski, 1996]. Dadurch nimmt die Membran kontinuierlich an Dicke zu, bis sie im Erwachsenenalter etwa eine Stärke von 10-15  $\mu\text{m}$  erreicht. Damit ist sie eine der kräftigsten Basalmembranen des Körpers [Raviv, 2010]. Die Descemet-Membran ist etwas elastisch und stellt diejenige Schicht der Hornhaut dar, die am widerstandsfähigsten gegen einen enzymatischen Abbau ist [Barraquer und Rutllan, 1991].

#### **2.2.5 Das Endothel**

Das Endothel überzieht als einschichtiges Plattenepithel die der vorderen Augenkammer zugewandte Seite der Hornhaut [Thews et al., 1999]. Diese Zellschicht besteht aus ca. 500.000 hexagonalen, abgeflachten Zellen, die jeweils etwa 5  $\mu\text{m}$  dick sind und einen Durchmesser von 20  $\mu\text{m}$  aufweisen [Barraquer und Rutllan, 1991]. Humane corneale Endothelzellzellen zeigen in vivo keine mitotische Aktivität. Daher sinkt die endotheliale Zelldichte, die bei einer vitalen, adulten Cornea etwa 2.500-3.000 Zellen/ $\text{mm}^2$  beträgt, zeitlebens jährlich um etwa 0,6%. Wenn corneale Endothelzellen infolge von Alterung, Trauma oder Erkrankung zugrunde gehen, werden die Defekte im Monolayer durch eine Zellvergrößerung benachbarter Zellen wieder geschlossen [Raviv, 2010].

Die Endothelzellen bilden, wie die Epithelzellen, zueinander zahlreiche Zellverbindungen aus. Allerdings sind diese Zellverbindungen, im Gegensatz zu denen in der epithelialen

Zellschicht, eher vom Macula occludens-Typ anstelle des Zona occludens-Typs. Das bedeutet, dass diese Verbindungsstellen zwischen den Zellen fleckenartig auftreten und die Zellen nicht gürtelförmig umgeben. Daher stellt die Endothelzellschicht eine durchlässigere Barriere dar. Auf der basolateralen Seite befinden sich zahlreiche Ionenpumpen, die für eine Entquellung der Stromamatrix sorgen. Diese beschriebenen Strukturen ermöglichen es dem Endothel, seine Funktionen als Regulator des Hydratationszustandes der Cornea und des Austausches von Stoffwechselprodukten wahrzunehmen [Raviv, 2010].

## **2.3 Ausgewählte Erkrankungen des Auges und deren Therapieoptionen**

Im folgenden Abschnitt wird auf ausgewählte Augenerkrankungen eingegangen. Dabei werden pathologische Zustände des Auges berücksichtigt, die in erster Linie mit einer lokalen medikamentösen Therapie behandelt werden, wobei die Cornea für die Wirkstoffe eine zu überwindende Barriere darstellt, bevor sie ihren pharmakologischen Effekt entfalten können. Außerdem werden einige Erkrankungen des Auges dargestellt, bei denen eine chirurgische Intervention in Form eines vollständigen oder partiellen Ersatzes der Cornea indiziert sein kann.

### **2.3.1 Erkrankungen des Auges mit vorwiegend medikamentöser Therapie**

Arzneistoffe können lokal am Auge in Form von wässrigen oder öligen Augentropfen, halbfesten Zubereitungen sowie seltener als Augenbäder, intravitreale, retrobulbäre oder subconjunctivale Injektionen appliziert werden [Mutschler et al., 2008]. Als weit häufigste Applikationsform werden Augentropfen verwendet. Diese stellen sterile wässrige oder ölige Lösungen oder Dispersionen eines oder mehrerer Arzneistoffe zur Anwendung am Auge durch Eintropfen in den Bindehautsack dar [Voigt und Fahr, 2006]. Um Reizungen zu vermeiden, sollten Augentropfen möglichst tränenisoton (310-334 mmol/kg) sein und dem pH-Wert der Tränenflüssigkeit von 7,1-7,6 entsprechen (Euhydrie) [Mutschler et al., 2008; Dolder und Skinner, 1990]. Augensalben sind sterile, halbfeste Zubereitungen, die zur



Anwendung auf der Augenbindehaut bestimmt sind und ebenfalls einen oder mehrere Arzneistoffe gelöst oder dispergiert enthalten [Voigt und Fahr, 2006]. Sie sollten reizlos sein und möglichst rasch als feiner Film über den Augapfel spreiten und dort gut haften bleiben. Wegen der damit einhergehenden möglichen Beeinträchtigung des Sehvermögens infolge von Schlierenbildung sollten Augensalben vornehmlich zur Nacht angewendet werden [Mutschler et al., 2008].

Neben Tränenersatzmitteln bei trockenem Auge, Vasokonstriktoren bei gereiztem Auge, Lokalanästhetika zur Schmerzfreiheit von Binde- und Hornhaut und Antiallergika zur Therapie und Prophylaxe von allergisch bedingter Bindehautentzündung, deren Wirkort vornehmlich an der Augenoberfläche ist, müssen andere Arzneistoffe zur Behandlung pathologischer Zustände des Auges (Glaukom, Infektion, Entzündung) oder diagnostisch zur Pupillenerweiterung eingesetzte Arzneistoffe in das Augeninnere eindringen, um zur Wirkung zu kommen. Die Hauptroute der okularen Absorption von topisch applizierten ophthalmologischen Arzneistoffen stellt die transzelluläre Passage der Cornea dar. Dabei permeieren lipophile Moleküle schneller und in einem größeren Ausmaß. Große und hydrophile Moleküle, für die der okulare Eintritt über den cornealen Absorptionsweg erschwert ist, nutzen eher den Passageweg über Conjunctiva und Sklera, um ins Augeninnere zu gelangen, da dies durch Poren im conjunctivalen Epithel begünstigt wird [Hornof et al., 2005; Erb und Schlote, 2011].

### **2.3.1.1 Corneale Absorption von Arzneistoffen**

Die Epithelschicht enthält mehr als zwei Drittel der Gesamtmasse an Zellmembranen der gesamten Hornhaut. Da die Membranen reich an Phospholipiden sind, hat das Epithel überwiegend lipophile Eigenschaften [Vogel und Berke, 1998]. Die Endothelzellschicht weist ebenfalls einen hohen Gehalt an Lipoiden auf. Folglich sind beide Gewebeschichten für lipophile Stoffe leicht zu durchdringen, während hydrophile Stoffe diese zelluläre Barriere nur schwer überwinden können [Dolder und Skinner, 1990]. Für die Permeationsbarriereeigenschaften des Epithels sind weiterhin die zwischen den Zellen befindlichen tight

junctions von größter Bedeutung, da sie als Zona occludens wirksam die parazelluläre Diffusion verhindern, die vor allem von hydrophilen Stoffen genutzt wird. Diese parazelluläre Barriere können lediglich kleine, hydrophile Substanzen wie Glycerol oder Mannitol passieren. Im Gegensatz dazu sind im einschichtigen cornealen Endothel die tight junctions zwischen den Zellen lediglich locker als eine Macula occludens angeordnet. Daher stellt insgesamt die corneale Epithelschicht die am meisten limitierende Barriere für topisch applizierte Ophthalmika dar [Vogel und Berke, 1998; Raviv, 2010]. Das stark hydratisierte Stroma stellt für hydrophile Stoffe nahezu kein Permeationshindernis dar [Dolder und Skinner, 1990]. Allerdings kann die Diffusion von stark lipophilen Substanzen durch die Cornea infolge des hydrophilen Stromas verlangsamt werden [Erb und Schlote, 2011; Hornof et al., 2005]. Insgesamt betrachtet sollte ein Arzneistoff daher ein ausgewogenes Verhältnis von lipophilen und hydrophilen Eigenschaften aufweisen, um mit hoher Rate das corneale Gewebe zu durchdringen [Vogel und Berke, 1998].

Um aus der wässrigen Tränenflüssigkeit durch die Cornea in das Kammerwasser der vorderen Augenkammer zu gelangen, muss der Arzneistoff das sich als eine dreischichtige Barriere aus lipophilen und hydrophilen Kompartimenten darstellende corneale Gewebe überwinden. Ein schematisches Modell der Permeation einer schwachen Base durch die Hornhaut ist in Abbildung 2.3 dargestellt. Viele der lokal am Auge applizierten Arzneistoffe sind schwache Basen wie z.B. Pilocarpin oder Atropin. Diese Arzneistoffe liegen bei dem im Tränenfilm vorherrschenden pH-Wert von durchschnittlich 7,35 überwiegend in ihrer neutralen Form vor, wodurch die Aufnahme in die Cornea erleichtert wird, da die freie Base durch das lipophile Epithel permeieren kann. Im wässrigen Stroma ist die Diffusion der protonierten Form des Arzneistoffs begünstigt. Wenn dieser das Endothel erreicht, ist es wiederum die ungeladene, nicht protonierte Base, die die lipophile zelluläre Barriere durchdringt. Im Kammerwasser liegt schließlich erneut vorwiegend die protonierte Form des Arzneistoffs vor [Dolder und Skinner, 1990; Vogel und Berke, 1998].

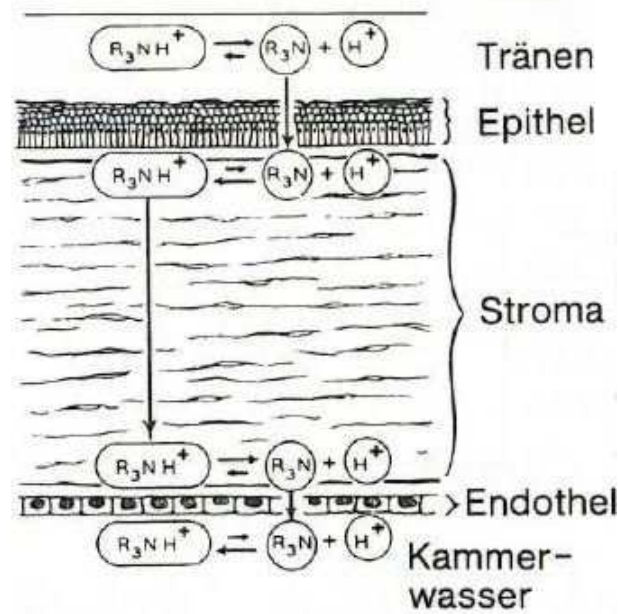


Abbildung 2.3: Modellhafte Darstellung der Permeation einer schwachen Base ( $R_3N$ ) durch die Cornea (Dolder und Skinner, 1990).

### 2.3.1.2 Das Glaukom

Unter dem Begriff Glaukom („Grüner Star“) werden verschiedene und besonders bedeutsame und häufige Formen einer Augenerkrankung zusammengefasst, die zu einer Schädigung der Sehnervenpapille mit Gesichtsfeldausfällen führt. Hauptrisikofaktor für die Entstehung eines Glaukomschadens ist ein individuell zu hoher Augeninnendruck [Mutschler et al., 2008]. Dabei führt eine anhaltende intraokulare Drucksteigerung allmählich zur Druckschädigung des Sehnervs und schließlich zur Erblindung. Der krankhaft erhöhte Augeninnendruck resultiert aus einem Missverhältnis von Kammerwasserbildung und Kammerwasserabfluss. Dementsprechend zielt die medikamentöse Therapie auf eine Senkung der Kammerwasserproduktion bzw. einen erleichterten Abfluss des Kammerwassers in den Kammerwinkel ab [Dolder und Skinner, 1990].

Klinisch unterschieden wird zwischen einem Offenwinkel- und einem Winkelblockglaukom. In über 90% der Fälle liegt ein Offenwinkelglaukom vor, das auch als Weitwinkelglaukom bezeichnet wird, bei dem das Kammerwasser das Trabekelmaschenwerk zwar ungehindert

erreichen, allerdings infolge struktureller Veränderungen der Trabekel nur schwer hindurchtreten kann. Weitere Abflusshindernisse können auch ein erhöhter Druck im Schlemm-Kanal oder eine Drucksteigerung in den kammerwasserableitenden Venen sein. Eine weitere Differenzierung wird in Abhängigkeit des gemessenen Augeninnendrucks vorgenommen: Bei einem Hochdruckglaukom liegt der intraokulare Druck über 21 mmHg, während sich dieser beim Normaldruckglaukom im Normbereich (10-21 mmHg) bewegt [Mutschler et al., 2008].

Bei dem wesentlich selteneren Winkelblock- oder auch Engwinkelglaukom liegt eine anlage- oder altersbedingte Verlegung des Kammerwinkels vor, die den Abfluss des Kammerwassers erschwert. Dieses Krankheitsbild geht rasch in einen dringend behandlungsbedürftigen, akuten Glaukomanfall über, der sich durch einen deutlichen Anstieg des Augeninnendrucks auszeichnet, begleitet von starken Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen [Mutschler et al., 2008; Dolder und Skinner, 1990].

Zur topischen Behandlung des Offenwinkel- und Engwinkelglaukoms werden verschiedene Arzneistoffgruppen in Mono- oder Kombinationstherapie eingesetzt [Mutschler et al., 2008; Erb und Schlote, 2011]:

- $\beta$ -Adrenorezeptorenblocker (z.B. Timolol, Levobunolol, Metipranolol) sorgen bei zweimal täglicher Applikation für eine gute Senkung des Augeninnendrucks durch eine Verminderung der Kammerwasserproduktion. Außerdem sorgen sie für eine Verbesserung des trabekulären Abflusses. Es wird vermutet, dass dies nicht auf direktem Wege erfolgt, sondern auf eine Degradation der Extrazellulärmatrix des Trabekelmaschenwerks zurückzuführen ist.
- Die sympathomimetisch wirkenden  $\alpha_2$ -Agonisten (z.B. Clonidin, Brimonidin) bewirken bei zwei- bis viermal täglicher Anwendung ebenfalls eine Reduktion der Kammerwasserproduktion. Außerdem sind sie in der Lage, den trabekulären und uveoskleralen Abfluss zu verbessern und den episkleralen Venendruck zu vermindern. Im zentralen Nervensystem können Clonidin und Brimonidin außerdem eine zentrale Augeninnendrucksenkung bewirken.

- Parasympathomimetika (z.B. Pilocarpin, Carbachol) führen bei drei- bis viermal täglicher Applikation zu einer Dauerkontraktion des Musculus sphincter pupillae und des Ziliarmuskels. Dadurch kommt es zur Verengung der Pupille (Miosis) und zu einer Erweiterung der Abflusswege im Trabekelwerk.
- Carboanhydrasehemmer (z.B. Dorzolamid, Brinzolamid) bewirken bei zwei- bis dreimal täglicher Anwendung eine effektive Hemmung der Kammerwasserbildung.
- Prostaglandinderivate (z.B. Latanoprost, Travoprost, Bimatoprost) werden vermehrt als First-line-Therapie eingesetzt, da sie bei nur einmal täglicher Anwendung eine stark drucksenkende Wirkung haben. Sie wirken über eine Verbesserung des uveoskleralen Kammerwasserabflusses. Zusätzlich kann der trabekuläre Kammerwasserabfluss durch eine Relaxation des Trabekelmaschenwerks unterstützt werden.

### **2.3.1.3 Entzündliche und infektiöse Erkrankungen des Auges**

Eine Entzündung ist eine Reaktion des Körpers unter Beteiligung des Immunsystems auf Reize, wie z.B. Mikroorganismen, chemische Substanzen oder Verbrennungen. Dabei treten die fünf Kardinalsymptome einer Entzündung, Rötung (rubor), Schwellung (tumor), Schmerz (dolor), Hitze (calor) und eine eingeschränkte Funktion (functio laesa) in Erscheinung. Grundsätzlich ist eine Entzündungsreaktion eine positive und lebenserhaltene Funktion, da sie der Bekämpfung eingedrungener Erreger oder der Heilung von Verletzungen dient. Häufig aber können Entzündungsreaktionen auch exzessiv verlaufen und zur Gewebeschädigung führen, die, am Auge auftretend, einen schwerwiegenden Augenschaden bis hin zur Erblindung bedingen kann. Daher ist in diesen Fällen eine entzündungshemmende Therapie indiziert. Bei einer erregerbedingten entzündlichen Erkrankung steht allerdings die Bekämpfung des Erregers im Vordergrund, da bei alleiniger Behandlung der Entzündungssymptome der Erregerausbreitung Vorschub geleistet wird [Vogel und Berke, 1998].

Eine Vielzahl von Mediatoren ist an der Entzündungsreaktion beteiligt, wie z.B. Prostaglandine und Leukotriene, die der Arachidonsäurekaskade entspringen. Infolge o.g. Reize werden unter Beteiligung der Phospholipase A2 Membranphospholipide in Arachidonsäure umgewandelt. Unter Einwirkung der Cyclooxygenasen 1 und 2 bzw. der Lipoxygenase entstehen aus dieser die Prostaglandine bzw. die Leukotriene. Die Bildung dieser Mediatoren kann durch antiphlogistisch wirksame Pharmaka unterdrückt werden.

Nichtsteroidale Antiphlogistika inhibieren die Prostaglandinsynthese durch Blockade der Cyclooxygenasen. Arzneistoffe dieser Wirkstoffgruppe (z.B. Diclofenac, Flurbiprofen, Ketorolac, Indometacin) werden bei nichtinfektiösen Entzündungen des vorderen Augenabschnittes, insbesondere in subakuten Krankheitsphasen, und bei allergischen Reaktionen eingesetzt. Über den gleichen Wirkmechanismus wird die analgetische Wirkung dieser Arzneistoffe vermittelt. Außerdem finden sie vor einer Operation zur Vermeidung einer intraoperativen Miosis Verwendung [Vogel und Berke, 1998; Mutschler et al., 2008].

Glucocorticoide (steroidale Antiphlogistika) stellen die effektivsten Entzündungshemmer am Auge dar. Sie wirken über eine Stimulation des Proteins Lipocortin, das die Phospholipase A2 zu hemmen vermag. Dadurch wird die Bildung der Prostaglandine und Leukotriene vermindert. Darüber hinaus verringern Glucocorticoide die Permeabilität der Blutgefäße, stabilisieren Zellmembranen und reduzieren die immunologische Aktivität von Lymphozyten. Lokal am Auge angewandte Wirkstoffe dieser Gruppe (z.B. Prednisolon, Dexamethason, Fluorometholon, Medryson, Hydrocortison) werden nach chemischen Verätzungen, Verbrennungen, allergischer Conjunctivitis, Uveitis anterior, Skleritis und Episkleritis, Keratoplastik sowie zur Vermeidung postoperativer Entzündungen eingesetzt. Für oberflächliche Entzündungen wird auf Wirkstoffe mit geringem Penetrationsvermögen (Fluorometholon, Medryson) zurückgegriffen, da so die als unerwünschte Nebenwirkung der Glucocorticoide auftretende intraokulare Drucksteigerung geringer ausfällt. Dagegen werden Dexamethason und Prednisolon aufgrund ihres guten Eindringvermögens zur Behandlung tieferer Entzündungsgeschehen eingesetzt [Vogel und Berke, 1998].

Bei erregerbedingten entzündlichen Erkrankungen von Hornhaut, Bindehaut sowie des vorderen Augenabschnittes wird mit lokal applizierten antiinfektiv wirksamen Ophthalmika therapiert [Vogel und Berke, 1998]. Bei den selten auftretenden Pilzerkrankungen des Auges werden Nystatin, Amphotericin B, Natamycin und Voriconazol als Lokalantimykotika am Auge eingesetzt, wobei Natamycin als Fertigarzneimittel in Form einer Augensalbe zur Verfügung steht [Mutschler et al., 2008; Grehn, 2012; Vogel und Berke, 1998].

Virale Infektionen des Auges sind beim Gesunden ebenfalls selten. Häufigste Erreger einer viralen Keratoconjunctivitis sind Adenoviren, Herpes-simplex-Viren oder Varizella-Zoster-Viren. Im Falle einer Adenovirus-Infektion, die häufig einer Atemwegserkrankung folgt, ist keine antivirale Therapie erforderlich, während bei einer Herpes-Infektion Aciclovir-Augensalbe, Ganciclovir-Augengel oder Trifluridin-Augentropfen eingesetzt werden. Bei einer Varizella-Zoster-Infektion wird darüber hinaus oft eine systemische Therapie notwendig [Vogel und Berke, 1998; Erb und Schlote, 2011].

Im Falle einer bakteriellen Infektion stehen diverse Arzneistoffe zur Verfügung, die je nach Empfindlichkeit des Keims eingesetzt werden [Erb und Schlote, 2011; Grehn, 2012; Vogel und Berke, 1998]:

- Aminoglykosid-Antibiotika (z.B. Gentamicin, Tobramycin, Kanamycin, Neomycin)
- Polypeptid-Antibiotika (z.B. Polymyxin B, Bacitracin)
- Makrolid-Antibiotika und Analoga (z.B. Erythromycin, Azithromycin)
- Gyrasehemmer (z.B. Ciprofloxacin, Ofloxacin, Norfloxacin, Levofloxacin, Moxifloxacin)
- Tetracycline (z.B. Tetracyclin, Oxytetracyclin)
- Chloramphenicol
- Fusidinsäure

Bakterielle Entzündungen der Bindehaut werden mit einer lokalen Gabe von Breitbandantibiotika zumeist in Monotherapie behandelt [Erb und Schlote, 2011]. Bei Verdacht einer Pseudomonas-Infektion sollte hingegen sofort mit einer Wirkstoffkombination aus Gentamicin und Polymyxin B oder einem Gyrasehemmer begonnen werden, bis das

Antibiogramm vorliegt [Grehn, 2012]. Eine bakterielle Keratitis (Hornhautentzündung), deren häufigste Erreger Staphylokokken und Pneumokokken sind, wird lokal mit antibiotischen Augentropfen behandelt, da so die höchste Antibiotikakonzentration im Hornhautulkus erreicht wird. Dabei sollte die Therapie vor Identifizierung des Keims und einer Resistenzprüfung sofort mit mindestens zwei hochwirksamen antibiotischen Wirkstoffen, z.B. Gentamicin, Polymyxin B, Norfloxacin, Moxifloxacin oder Chloramphenicol, begonnen werden. Danach wird auf das höchstwirksame spezifische Antibiotikum gewechselt [Grehn, 2012].

Die durch Protozoen ausgelöste Acanthamoeben-Keratitis, deren Erreger ubiquitär u.a. in Trinkwasser und verschmutzten Kontaktlinsenbehältern vorkommt, ist durch ein oft wochenlang therapieresistentes, hochgradig schmerzhaftes Hornhautulkus charakterisiert. Es erfolgt eine lokale medikamentöse Therapie mit einer Dreifachkombination von Augentropfen, die ein kationisches Antiseptikum, z.B. Polyhexamethylen-Biguanid, ein Aminoglykosid-Antibiotikum, z.B. Gentamicin, und das die DNA-Synthese der Protozoen hemmende Propamidin beinhaltet. Häufig wird allerdings eine chirurgische Therapie in Form einer Hornhauttransplantation erforderlich [Grehn, 2012].

### **2.3.2 Erkrankungen der okularen Oberfläche mit operativen Therapieoptionen**

Schwerwiegende Erkrankungen der Cornea können zum vollständigen Verlust der Sehfähigkeit führen. Weltweit sind pathologische Veränderungen der Cornea die zweithäufigste Ursache für Erblindung nach dem Katarakt. So sind etwa 5 Millionen Menschen von einer Erblindung durch Trachom (siehe 2.3.2.2) betroffen. Weitere 1,5-2 Millionen Fälle von monookularer Erblindung sind jährlich auf okulare Traumen oder corneale Ulzeration zurückzuführen [Whitcher et al., 2001]. Bei einigen pathologischen Funktionsstörungen der Augenoberfläche kann die Sehfähigkeit nur durch eine chirurgische Intervention in Form einer Hornhauttransplantation (Keratoplastik) verbessert bzw. wiederhergestellt werden. Zu diesen Indikationen zählen neben dem Trachom beispielsweise der Keratokonus (siehe 2.3.2.1), eine endotheliale Insuffizienz (siehe 2.3.2.3),



Tumorerkrankungen, corneale Vernarbungen durch Infektionen, Verätzungen, Verbrennungen oder stumpfe Traumen, die von einer Hornhauttrübung begleitet werden [Barraquer und Rutllan, 1991]. Ebenso kann bei schnell einschmelzendem oder perforiertem Hornhautulkus eine akute Hornhauttransplantation (Keratoplastik à chaud) als Notfallmaßnahme notwendig sein [Grehn, 2012].

Eine Corneatransplantation wird als perforierende oder lamelläre Keratoplastik ausgeführt. Bei der perforierenden Keratoplastik wird das pathologische corneale Gewebe in vollständiger Dicke kreisrund mit einem Trepan ausgeschnitten. Dann wird das zuvor aus einem Spenderbulbus entnommene Corneatransplantat, das den gleichen oder einen um maximal 0,2 mm größeren Durchmessers aufweist, eingefügt und durch eine sternförmig verlaufende, kontinuierliche Naht, durch Einzelknopfnähte oder eine Kombination von beiden mittels sehr feiner Nylonfäden fixiert. Da durch den Ersatz aller Schichten der Hornhaut der Augapfel eröffnet wird, ist eine perforierende Keratoplastik stets mit einem Infektionsrisiko und anderen möglichen Komplikationen wie Kataraktbildung, Sekundärglaukom oder Netzhautablösung behaftet [Barraquer und Rutllan, 1991; Grehn, 2012; Kanski, 1996; Daoud und Kim, 2010].

Bei der technisch schwierigeren lamellären Keratoplastik wird die Cornea nicht vollständig transplantiert, sondern krankhaft veränderte Schichten bzw. Lamellen werden ersetzt, während funktionale Gewebeschichten erhalten bleiben. Die Technik der anterioren lamellären Keratoplastik, die das Epithel, die Bowman-Membran und das anteriore Stroma ersetzt, wird eingesetzt, wenn nur die oberflächlichen Bereiche der Hornhaut pathologisch verändert sind. Bei der posterioren lamellären Keratoplastik wird das Spendergewebe aus Endothel und Descemet-Membran und gegebenenfalls Anteilen des posterioren Stromas durch einen kleinen Hornhautschnitt auf die Innenseite der Empfängerhornhaut transplantiert. Diese Operationstechniken weisen gegenüber der perforierenden Keratoplastik ein geringeres Risiko an Komplikationen auf und ermöglichen in der Regel eine zügige Abheilung mit einer schnelleren Wiederherstellung der Sehfähigkeit [Daoud und Kim, 2010; Grehn, 2012].

In einigen Fällen der cornealen Erblindung, bei denen eine Hornhauttransplantation nicht möglich ist oder die eine schlechte Prognose aufweisen, wie z.B. bei limbalen Stammzellinsuffizienz, wiederholten Transplantatabstoßungen oder schwerem Sicca-Syndrom, kann auch durch Einsetzen einer künstlichen Keratoprothese das Sehvermögen wiederhergestellt werden, sofern der posteriore Sehapparat intakt ist. Diese Keratoprothesen aus synthetischen, biokompatiblen Polymeren setzen sich aus einem festen, transparenten, optischen Zentrum zur Ermöglichung der Lichttransmission und einem äußeren Ringsegment zusammen, über das die Verankerung im Gewebe erfolgt. Allerdings kann diese anspruchsvolle und zeitintensive Operation nur in wenigen spezialisierten Zentren durchgeführt werden [Daoud und Kim, 2010; Griffith et al., 2002a]. Eine Zusammenfassung über die Entwicklung und den Einsatz von Keratoprothesen geben Ruberti et al. [2007].

Neben der Hornhauttransplantation stellt die Transplantation cornealer limbalen Stammzellen, die bei limbalen Stammzellinsuffizienz indiziert ist, eine wichtige chirurgische Intervention an der Augenoberfläche dar. Im Folgenden wird dieses Krankheitsbild ebenso wie einige andere mit operativen Techniken behandelbare, pathologische Zustände der Augenoberfläche näher erläutert.

### **2.3.2.1 Der Keratokonus**

Keratokonus bezeichnet eine kegelförmige Vorwölbung der Hornhautmitte mit Verdünnung und später auch Trübung der Hornhaut, die mit einer Inzidenz von 1:2000 in der Gesamtbevölkerung auftritt. Diese anlagebedingte, im Großteil der Fälle bilateral auftretende, corneale Degeneration tritt meist in der Pubertät erstmals in Erscheinung und verläuft chronisch progredient. Als Ursache wird eine Schwäche des Hornhautcollagens bei normalem Collagengehalt der Cornea angenommen, die eine irreguläre Krümmung der Hornhaut erlaubt. Dadurch kommt es zu einem irregulären Astigmatismus, der mit einer Brille nur schwer zu korrigieren ist. Durch die zunehmende Verdünnung des Stromas kann es schließlich zum Einreißen der Descemet-Membran und des Endothels kommen, wobei das nachfolgend in das Stroma eindringende Wasser eine plötzliche Trübung hervorruft begleitet

von plötzlicher Visusminderung und starken Schmerzen (akuter Keratokonus). In den Anfangsstadien der Erkrankung werden therapeutisch individuell angepasste formstabile Kontaktlinsen verwendet, die den Brechungsfehler ausgleichen können. Bei fortschreitender Erkrankung ist ein Anhaften der Kontaktlinsen auf der Augenoberfläche durch die zunehmend spitzkegelige Kontur deutlich erschwert. Daher wird in 20% der Fälle eine Hornhauttransplantation erforderlich, die als perforierende oder tiefe anteriore lamelläre Keratoplastik ausgeführt werden kann [Grehn, 2012; Kohlhaas, 2008; Wollensak et al., 2003a; Maier und Reinhard, 2013; Raiskup und Spörl, 2013a].

Eine neuere Therapieform zum Aufhalten der Progredienz des Keratokonus stellt die photochemische Quervernetzung des stromalen Collagens dar, die zu einer erhöhten biomechanischen Festigkeit des cornealen Gewebes führt. Diese von Spörl et al. entwickelte Methode der Riboflavin/UVA-Behandlung findet mittlerweile verbreitet klinische Anwendung [Spörl et al., 1997; Maier und Reinhard, 2013]. Bei der klassischen Durchführung wird zunächst unter lokaler Anästhesie eine Epithelabrasio durchgeführt, da das corneale Epithel eine Diffusionsbarriere für das im Folgenden applizierte Riboflavin darstellt. Die Applikation des als Photosensibilisator fungierenden Riboflavins erfolgt tropfenweise als 0,1%ige Lösung, wobei mit dieser etwa 20-30 Minuten vor der UVA-Bestrahlung begonnen werden muss, um eine Diffusion des Riboflavins in tiefere Stromaschichten zu ermöglichen. Die Bestrahlung mit UVA-Licht einer Wellenlänge von 370 nm erfolgt mit einer Bestrahlungsstärke von 3 mW/cm<sup>2</sup> über 30 Minuten auf einer kreisrunden Fläche von 8 mm Durchmesser im Abstand von 1 cm. Während der Bestrahlung wird die Applikation der Riboflavin-Augentropfen fortgesetzt, um eine Austrocknung der Cornea zu verhindern und die Konzentration des Photosensibilisators im Stroma aufrechtzuerhalten. Durch die so gewählten Behandlungsparameter von Riboflavinkonzentration, Inkubationszeit und Bestrahlungsdosis wird gewährleistet, dass bei einer mindestens 400 µm dicken Cornea 90% der Strahlung im Stroma absorbiert werden, sodass die tiefer liegenden Bereiche (Endothel, Linse und Netzhaut) weitestgehend vor dem UVA-Licht geschützt sind [Wollensak et al., 2003a, b, c; Spörl et al., 2008]. Corneae von geringerer Dicke sind von der

Behandlung auszuschließen oder erfordern eine Adaption des Prozesses, z.B. in Form von hypoosmolaren Riboflavin-Augentropfen, die für eine Quellung der Cornea auf die erforderliche Dicke sorgen [Raiskup und Spörl, 2013a].

Der Mechanismus der Verfestigung beruht darauf, dass Riboflavin als Photosensibilisator wirkt und dadurch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies erleichtert. Dafür geht das Riboflavin-Molekül durch die UVA-Strahlung zunächst selbst in einen angeregten Zustand über und interagiert dann mit Triplett-Sauerstoff, wodurch Singulett-Sauerstoff gebildet wird. Dieser ist in der Lage, für eine oxidative Desaminierung von Aminogruppen in den Seitenketten des Collagenmoleküls zu sorgen. Die dabei entstehenden Aldehydgruppen reagieren wiederum mit verbleibenden Aminogruppen unter Aldiminbildung und Aldolkondensation, wobei kovalente inter- und intramolekulare Bindungen der Collagenstränge geknüpft werden [Spörl et al., 2008; Kohlhaas, 2008].

Der Oberflächendefekt durch die Abrasio ist in der Regel nach 5 Tagen reepithelisiert. Dennoch ist diese Beschädigung der Augenoberfläche nicht schmerzfrei für den Patienten [Kohlhaas, 2008]. Bei einer weiteren Variation der Behandlungsmethode wird auf die initiale Epithelabrasio verzichtet. Allerdings muss dann anderweitig für eine ausreichende Diffusion des Riboflavins in das Hornhautstroma gesorgt werden, z.B. durch die Erhöhung der Permeabilität des Epithels für Riboflavin mittels Applikation von Benzalkoniumchlorid, durch eine Erhöhung der Verweildauer der Riboflavin-Augentropfen am Auge durch Viskositätserhöhung der Lösung oder Aufbringen von ringförmigen Barrieren, die ein Abfließen des Photosensibilisators verhindern [Raiskup und Spörl, 2013a].

#### **2.3.2.2 Das Trachom**

Dem Trachom geht eine Infektion der Conjunctiva mit dem Erreger Chlamydia trachomatis des Serotyps A, B oder C voraus. Eine solche Infektion, begünstigt durch schlechte hygienische Verhältnisse, wird durch Fliegen oder andere Insekten übertragen, die sich auf den Lidrand setzen, und führt unbehandelt zur Erblindung, sodass diese Erkrankung in Entwicklungsländern eine der häufigsten Ursachen für den Verlust der Sehfähigkeit ist. Im

Anfangsstadium besteht eine seröse Conjunctivitis, die mit der Bildung von großen, unter dem Tarsus (Lidknorpel) des Oberlides gelegenen Follikeln einhergeht. Schließlich platzen die Follikel unter Entleerung eines infektiösen Sekrets und vernarben. Vom oberen Hornhautrand wächst eine mit Follikeln durchsetzte Trübung über die obere Hornhaut. Der Tarsus des Oberlides schrumpft und die Wimpernreihe wird nach innen gezogen. Dadurch scheuern die Wimpern bei jedem Lidschlag auf der Cornea und erzeugen ein Hornhautulkus. Im Endstadium eines schweren Trachoms besteht eine porzellanartige Hornhautnarbe aus metaplasierter Bindehaut- und Hornhautepithel mit wenigen Gefäßen. Therapie der Wahl im follikulären Stadium ist eine dreitägige systemische Therapie mit Azithromycin. Alternativ können Doxycyclin, Cotrimoxazol, Tetracyclin oder Erythromycin über 2-3 Wochen peroral angewendet werden. In dem fortgeschrittenen Narbenstadium ist neben einer chirurgischen Lidrandkorrektur eine Keratoplastik für den Erhalt des Sehvermögens erforderlich [Erb und Schlote, 2011; Grehn, 2012].

### **2.3.2.3 Endothelinsuffizienz**

Einige Erkrankungen oder Verletzungen der Hornhaut können zum Untergang der cornealen Endothelzellen führen, beispielsweise die Fuchs-Endotheldystrophie, eine anlagebedingte beidseitige Erkrankung des höheren Lebensalters. Wenn die Zelldichte des Endothels auf unter 700 Zellen/mm<sup>2</sup> absinkt, ist die Pumpfunktion der verbleibenden Endothelzellen nicht mehr ausreichend. Infolge dieser Endothelinsuffizienz kommt es durch Wassereinlagerung zur Quellung des cornealen Stromas und Epithels, was mit einer Trübung der Hornhaut und eingeschränktem Sehvermögen einhergeht. In vielen Fällen wird eine Hornhauttransplantation erforderlich, die früher vornehmlich als perforierende Keratoplastik durchgeführt wurde. Heutzutage wird die hintere lamelläre Keratoplastik bevorzugt, bei der nur das Endothel und die Descemet-Membran des Patienten durch eine dünne innere Lamelle der Spenderhornhaut (aus Endothel, Descemet-Membran und einem dünnen Stromaanteil) ersetzt werden. Mittels einer neueren Technik werden heute auch reine Descemet-Membran-Endothel-Transplantate eingesetzt [Grehn, 2012; Pieramici et al., 2010].

#### **2.3.2.4 Verbrennungen und Verätzungen**

Verbrennungen am Auge entstehen durch heiße Fettspritzer, kochendes Wasser, heißes, flüssiges Metall, gelegentlich auch durch Blitzschlag oder Unfälle mit Hochspannungsstrom. In der Regel ist nur das Epithel oder auch das oberflächliche Stroma betroffen, sodass meist keine oder nur geringfügige Narbenbildung zurückbleibt. Bei leichten Verbrennungen werden antibiotische Augensalben zur Infektionsprophylaxe und pflegende Salben zur Förderung der Reepithelisierung eingesetzt. Bei schweren Verbrennungen mit Schrumpfung und Koagulation des Hornhautcollagens sowie schwerer Schädigung von Bindehaut und Lidrändern sind allerdings chirurgische Maßnahmen, die eine Hornhauttransplantation einschließen, erforderlich [Grehn, 2012].

Verätzungen mit Laugen oder Säuren treten am häufigsten in der Bau- oder metallverarbeitenden Industrie, bei Unfällen mit Putzmitteln oder Chemikalien sowie bei unsachgemäßem Umgang mit Autobatterien auf. Säureverätzungen erzeugen in leichten bis mittelschweren Fällen eine Koagulationsnekrose, die das tiefere Eindringen der Säure verhindert. Daher sind Säureverätzungen weniger gefährlich als Laugenverletzungen des gleichen Grades. Diese rufen durch Verseifung der cornealen Lipide eine Kolliquationsnekrose aus und dringen außerdem durch die Hydrolyse von Proteinen und Proteoglykanen tief in das Gewebe ein, sodass die Hornhaut perforiert werden kann und eine Schädigung dahinterliegender Augenabschnitte möglich ist [Grehn, 2012].

Eine leichte Verätzung bleibt auf das Epithel begrenzt, wobei die limbale Stammzellregion erhalten bleibt. Daher kann das Epithel ausgehend vom Limbus vollständig regenerieren. Wenn auch die Bowman-Membran intakt bleibt, heilt die Verätzung ohne Narbenbildung aus. Eine schwere Verätzung ist durch eine Schädigung der limbalen Stammzellen gekennzeichnet, die in der Heilungsphase eine Trübung der Hornhaut durch ein Überwachsen mit Bindehautepithel zur Folge hat. Schwerste Verätzungen, meist durch Laugen ausgelöst, führen zu einer nekrotischen Schrumpfung der Bindehaut und bereits initial zu einer ausgeprägten Hornhauttrübung. Oft kommt es außerdem zur Linsentrübung und zu einem sekundären Glaukom, die zur vollständigen Erblindung führen können. Bei

schweren und schwersten Verätzungen ist nach der initialen Abheilung vielfach ein chirurgisches Eingreifen indiziert in Form einer limbalen Stammzelltransplantation, einer Keratoplastik oder einer Keratoprothese neben der operativen Korrektur weiterer in Mitleidenschaft gezogener okularer Strukturen [Grehn, 2012; Hamrah und Eiferman, 2010].

#### **2.3.2.5 Limbale Stammzellinsuffizienz**

Einige pathologische Zustände der Augenoberfläche, die angeboren oder erworben sein können, z.B. infolge von schweren mikrobiellen Infektionen, Verbrennungen, Verätzungen, Bestrahlung, Stevens-Johnson-Syndrom oder multiplen Operationen im Limbusbereich, können sich durch eine Schädigung der corneoskleralen Limbusregion, in der sich die cornealen epithelialen Stammzellen befinden, in einer limbalen Stammzellinsuffizienz manifestieren. Diese hat zur Folge, dass die corneale Oberfläche mit conjunctivalen Epithelzellen überwachsen wird, begleitet von einer Vaskularisierung, Destruktion der Basalmembran, chronischer Entzündung und Vernarbung der Cornea. Eine konventionelle Keratoplastik stellt keine aussichtsreiche Therapieoption dar, da das implantierte Gewebe nur kurzlebige corneale Epithelzellen einbringt und durch die Vaskularisierung und Entzündung ein erhöhtes Risiko einer Transplantatabstoßung besteht. Daher wird eine limbale Stammzelltransplantation durchgeführt. Das conjunctival-limbale Gewebe dafür kann autolog von einem gesunden Partnerauge oder bei bilateraler limbaler Stammzellinsuffizienz allogon von einem lebenden Verwandten oder einem anonymen Organspender entnommen werden [Daoud und Kim, 2010].

### **2.4 Zellkulturen und Zellkulturmodelle**

Die Anfänge der Gewebekultur lassen sich auf den Beginn des 20. Jahrhunderts datieren. Diese Technik erlaubte es fortan, das Verhalten von Zellen unabhängig von systemischen Einflussfaktoren des Gesamtorganismus zu studieren. Der Begriff Gewebekultur umfasst dabei sowohl die Organkultur, die eine dreidimensionale Kultivierung von nicht

desaggregiertem Gewebe unter Erhaltung einiger oder aller histologischer Merkmale des In-vivo-Gewebes umschreibt, als auch die Zellkultur, die die Kultivierung von dispergierten Zellen bezeichnet, die aus einem originalen Gewebe, einer Primärkultur oder einer Zelllinie durch enzymatische, mechanische oder chemische Desaggregation gewonnen wurden. Aus der Zellkultur lassen sich dann die histotypischen Kulturen und die organotypischen Kulturen ableiten. Während die histotypischen Kulturen das Wachstum einzelner Zelllinien in hoher Dichte in einem dreidimensionalen Verband bezeichnen, werden bei der organotypischen Kultur Zellen verschiedenen Ursprungs unter definierten Bedingungen kombiniert mit dem Ziel, ein Gewebeäquivalent zu formen [Freshney, 2005]. Die Technik der organotypischen Kultur wird heute eingesetzt, um Modelle vieler Gewebestrukturen, wie Haut, Blutgefäße, Leber, Niere, Blase, Herz- und Skelettmuskulatur, Knochen, Knorpel und Sehnen, einschließlich der Cornea zu bilden [Atala und Lanza, 2002; Lanza et al., 2007].

Ab den 1950er Jahren erlebte die Gewebekultur einen rasanten Aufschwung, zurückzuführen vor allem auf die Einführung von Antibiotika, die weitgehend vor einer mikrobiellen Kontamination der Kulturen schützen konnten, und der Entwicklung definierter und später auch serumfreier Kultivierungsmedien. Durch die Technik der Transformation konnten aus nativen Zellen, die in der Regel eine begrenzte Lebensspanne von 20-100 Generationen aufweisen, verbunden mit Alterungsprozessen und einer zum Ende hin deutlich verminderten Wachstumsrate, immortalisierte Zelllinien erzeugt werden. Bei dieser Technik werden virale Gensequenzen, wie das Large T Antigen-Gen des Simian-Virus 40 (SV40), in das Genom der Zelle eingeschleust, wodurch der Übergang in die Seneszenz verhindert werden kann. Die so entstehenden Zelllinien mit verlängerter Lebensdauer stellen eine stabile, kontinuierlich wachsende Zellpopulation dar, deren Einsatz für viele Fragestellungen der Forschung sowie für die Testung von Chemikalien oder Arzneistoffen vorteilhaft ist [Freshney, 2005; Griffith et al., 2002a, 2002b]. Eine chronologische Auflistung von Meilensteinen der Gewebekultur gibt Freshney [2005].

Mittlerweile findet die Gewebekultur vielfachen Einsatz in wissenschaftlicher Forschung und Praxis, wie z.B. bei den Untersuchungen von Zell-Zell-Interaktionen und intrazellulären



Vorgängen wie Zellzyklus, Differenzierung oder Metabolismus, bei der Erforschung von Tumorerkrankungen, bei der Produktion antiviraler Impfstoffe, bei der Entwicklung monoklonaler Antikörper mittels der Hybridomatechnik sowie zur Qualitätskontrolle von Trinkwasser [Freshney, 2005]. Auf die Etablierung cornealer Zellkulturen und deren Verwendung als In-vitro-Modelle sowie deren Perspektiven in der regenerativen Medizin wird in den folgenden Abschnitten näher eingegangen.

### **2.4.1 Corneale Epithelzellen**

Primäre corneale Epithelzellen können auf mechanischem oder enzymatischem Wege aus dem cornealen Gewebe isoliert werden. In beiden Fällen sollte das Gewebestück vor der Isolierung durch gründliches Spülen von lose anhaftenden Zellen befreit werden, um eine Kontamination der Kultur mit Zellen anderen Ursprungs, insbesondere stromalen Zellen, zu vermeiden. Bei der mechanischen Isolierung wird das Epithel unter mikroskopischer Kontrolle vorsichtig mit einem Skalpell abgeschabt, wobei darauf zu achten ist, die Bowman-Membran nicht zu verletzen, um ein Freisetzen von stromalen Zellen zu vermeiden. Die erhaltenen epithelialen Zellcluster können dann mit dem Skalpell weiter zerkleinert werden oder mittels Auf- und Abpipettieren oder Einwirkung von Trypsin vereinzelt und in das Kultivierungsgefäß überführt werden. Den Kulturen kann frisches Medium ergänzt werden, allerdings sollte vor Austausch des Mediums sichergestellt werden, dass die Zellen an der Kultivierungsoberfläche anhaften und begonnen haben, sich auszubreiten [Griffith et al., 2002b]. Es ist auch möglich, die cornealen Epithelzellen auf mechanischem Wege zu isolieren, indem die Cornea in kleine Stücke zerteilt wird, die mit der Epithelseite nach unten in ein Kultivierungsgefäß überführt werden, um dort zunächst zu adhären, bevor mit Kultivierungsmedium versetzt wird. Innerhalb von 5 Tagen ist ein ausreichendes Auswachsen der Epithelzellen aus den Gewebestücken zu beobachten, sodass diese aus dem Kulturgefäß entfernt werden können [Kahn et al., 1993]. So wird eine Kontamination mit stromalen Zellen verhindert, da diese im Vergleich zu Epithelzellen erst verzögert aus dem Gewebestück herauswachsen [Stocker et al., 1958].

Alternativ können corneale Epithelzellen enzymatisch isoliert werden. Dafür wird zunächst mit Hilfe einer feinen Pinzette die Descemet-Membran mit dem anhaftenden Endothel entfernt. Das verbleibende corneale Gewebe wird mit Dispase inkubiert, einer Protease, die in der Lage ist, die Epithelschicht vollständig als ein Ganzes abzulösen. Im Anschluss wird die Epithelschicht, wie bei der oben beschriebenen, mechanischen Isolierung, zerteilt bzw. vereinzelt und in die Kulturgefäße überführt [Griffith et al., 2002b].

Die Kultivierung cornealer Epithelzellen erfolgt häufig in Grundmedien wie DMEM, Ham's F12, Medium 199 oder Mischungen von diesen mit einem Zusatz von 5-10% Serum und verschiedenen Wachstumsfaktoren und Hormonen wie EGF, Insulin oder Hydrocortison sowie Spurenelementen. Auch eine Kultivierung unter serumfreien Bedingungen ist möglich [Kahn et al., 1993]. Dadurch kann die Standardisierbarkeit der Kultivierungsbedingungen erhöht werden, da der Nachteil der chargenweise schwankenden Serumzusammensetzung mit teils unbekannten Komponenten vermieden wird [Freshney, 2005].

Neben der Kultivierung der nativen cornealen Epithelzellen wurden in den letzten Jahren auch immortalisierte corneale Epithelzelllinien beschrieben, die zur Prüfung okularer Toxizität oder für In-vitro-Permeationsuntersuchungen an epithelialen Schichten eingesetzt werden können [Kahn et al., 1993; Araki-Sasaki et al., 1995; Toropainen et al., 2001]. Für ein auf der immortalisierten humanen Corneaepithelzelllinie HCE-T (siehe 3.2.2.1) basierendes Epithelmodell konnte neben der Eignung als Permeationsmodell auch die metabolische Aktivität von Esterasen nachgewiesen werden [Becker et al., 2008; Toropainen et al., 2003]. Allerdings zeigte der Vergleich mit humaner Cornea, dass sich das Expressionsmuster funktioneller ATP-abhängiger Transportproteine in den HCE-T-Zellen deutlich von dem des nativen cornealen Gewebes unterscheidet [Becker et al., 2007]. Des Weiteren wurde für die HCE-T-Zelllinie auch die Möglichkeit der serumfreien Kultivierung beschrieben [Seeber et al., 2008; Hahne und Reichl, 2011].

Sowohl für Epithelmodelle basierend auf nativen als auch auf immortalisierten Zellen hat sich die Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze als kritischer Faktor erwiesen für die Förderung der Ausbildung einer dichten epithelialen Barriere [Kahn et al., 1993; Chang et al., 2000].

Neben den zentral isolierten cornealen Epithelzellen besteht die Möglichkeit, corneale epitheliale Stammzellen der Limbusregion aus corneoskleralen Ringen zu gewinnen, die häufig bei Hornhauttransplantationen nach Trepanation des zu transplantierenden zentralen Corneabereichs aus dem Spendermaterial zurückbleiben [Griffith et al., 2002b]. Gegenüber den zentral isolierten Zellen zeichnen sich die Epithelzellen limbalen Ursprungs dadurch aus, dass die Kultur eine größere Anzahl von Zellpassagen überdauern kann [Ruberti et al., 2007]. Derzeit sind limbale Stammzellen Gegenstand zahlreicher Forschungsbestreben, wobei die Ex-vivo-Expansion limbalen Stammzellen auf Amnionmembran zur Transplantation bei limbalen Stammzellinsuffizienz bereits klinische Anwendung findet [Dua et al., 2004; Fernandes et al., 2005; Kruse und Cursiefen, 2008; Meller et al., 2011].

#### **2.4.2 Corneale Stromazellen**

Wie auch in vivo können corneale stromale Zellen unter Bedingungen der In-vitro-Kultivierung unterschiedliche Phänotypen ausprägen. So entsteht unter den meist gegebenen serumhaltigen Kultivierungsbedingungen der spindelförmige Fibroblasten-Phänotyp, während der eher dendritische Keratozyten-Phänotyp nur bei serumfreier Kultivierung erhalten bleibt [Beales et al., 1999]. Der Myofibroblasten-Phänotyp lässt sich durch die Zugabe von TGF $\beta$  zum Kulturmedium erhalten [Jester et al., 1996]. Daher sollten die Bedingungen bereits bei der Isolierung entsprechend des gewünschten Phänotyps gewählt werden.

Für die Isolierung von Fibroblasten-Kulturen sollten zunächst unter mikroskopischer Kontrolle die Epithel- und die Endothelzellschicht vom cornealen Gewebe entfernt werden. Dies kann entweder mechanisch durch Abschaben mit einem Skalpell oder enzymatisch mit Collagenase erfolgen. Das in Stücke geschnittene Stromagewebe kann durch Inkubation mit Collagenase I enzymatisch aufgeschlossen werden. Die verbleibenden Gewebestücke werden in ein Kulturgefäß überführt, um dort zu adhären, bevor sie mit serumhaltigem Kulturmedium versetzt werden, wobei sie infolge des enzymatischen Abbaus mit einer Pinzette leicht weiter zerteilt werden können [Griffith et al., 2002a]. Kulturen cornealer

stromaler Zellen können auch nach mechanischer Entfernung von Epithel und Endothel mittels reiner Explantattechnik ohne enzymatische Einwirkung gewonnen werden [Stocker et al., 1958]. Insgesamt sind Fibroblastenkulturen leicht zu etablieren, da sie ein expansives Wachstum zeigen und geringe Ansprüche an die Zusammensetzung des Kulturmediums stellen. Meist erfolgt eine Kultivierung in einem Basalmedium wie DMEM mit einem Serumzusatz von 5-10%. Fibroblasten können aber dadurch bei der Gewinnung von reinen Epithel- oder Endothelzellkulturen Schwierigkeiten bereiten, wenn sie als Kontamination in diese gelangen, da sie diese Zellen nach wenigen Tagen überwachsen können [Stocker et al., 1958].

Die Gewinnung von Kulturen des Keratozyten-Phänotyps kann erfolgen, indem die Cornea zunächst für 45 Minuten mit Collagenase behandelt wird, um das Epithel, das Endothel und geschädigte, stromale Zellen an der Schnittkante zu entfernen. Im Folgenden wird mit frischer Collagenase inkubiert, um die Keratozyten aus dem Stromagewebe freizusetzen. Die Kultivierung muss dann in einem serumfreien Medium erfolgen [Griffith et al., 2002a].

Anders als in vivo scheint bei der In-vitro-Kultivierung stromaler cornealer Zellen die Transformation der Keratozyten in den Fibroblasten-Phänotyp zumindest teilweise umkehrbar. So konnten Berryhill et al. zeigen, dass Fibroblasten nach Serumentzug wieder die Morphologie von Keratozyten annahmen und wieder ein für Keratozyten typisches Expressionsmuster von Proteoglykanen aufwiesen, wenngleich auch die in Keratozyten normalerweise in hohem Maße vorkommende Aldehyddehydrogenase nicht wieder nachgewiesen werden konnte [2002]. Neben der Serumfreiheit des Kultivierungsmediums scheint auch die Kultivierung in einem dreidimensionalen Collagensubstrat den Keratozyten-Phänotyp zu fördern [Thompson et al., 2013].

Kultivierte corneale Stromazellen sind in der Lage, Bestandteile der sie in vivo umgebenden extrazellulären Matrix zu bilden. Stoesser et al. und Grinnell et al. konnten zeigen, dass es möglich ist, in vitro die Synthese collagenhaltiger extrazellulärer Matrix anzuregen, indem Vitamin C (Ascorbinsäure) als Supplement dem Kulturmedium der Fibroblasten hinzugefügt wurde [Stoesser et al., 1978; Grinnell et al., 1989]. Auch die Bildung von Proteoglykanen ist

unter Bedingungen der In-vitro-Kultivierung möglich [Hassel et al., 1992; Musselmann et al., 2006; Ren et al., 2008; Etheredge et al., 2009].

Unter serumhaltigen Kultivierungsbedingungen ist die Transformierung humaner cornealer Stromazellen gelungen, wobei immortalisierte Zelllinien erhalten wurden [Griffith et al., 1999; Zorn-Kruppa et al., 2005]. Die immortalisierte humane corneale Keratozytenzelllinie HCK (siehe 3.2.2.2) konnte im Folgenden auch an eine serumfreie Kultivierung adaptiert werden, wobei sie Eigenschaften des Keratozyten-Phänotyps zeigt hinsichtlich Morphologie, Proliferationsverhalten und fehlender Kontraktion einer sie umgebenden Collagenmatrix [Manzer et al., 2009].

#### **2.4.3 Corneale Endothelzellen**

Die Isolierung cornealer Endothelzellen kann analog zur mechanischen Isolierung cornealer Epithelzellen erfolgen. Nach dem Abspülen lose anhaftender Zellen werden die Endothelzellen unter mikroskopischer Kontrolle vorsichtig mit einem Skalpell abgetragen, wobei ein Verletzen der Descemet-Membran zu vermeiden ist, um eine Kontamination der Kultur mit stromalen Zellen zu verhindern, und in ein Kultivierungsgefäß überführt. Vor einem vollständigen Wechsel des Mediums sollte auch hier auf das Anhaften der Zellen geachtet werden. Gegebenenfalls kann die Adhärenz der Zellen durch einen Zusatz von 0,01% Fibronektin zum Kulturmedium gefördert werden. Falls dennoch Stromazellen in die Kultur gelangt sein sollten, ist es erforderlich, die Kolonien der endothelialen Zellen in ein neues Kulturgefäß zu überführen [Griffith et al., 2002a]. Alternativ können stromale Zellen durch ein selektives Medium, das D-Valin anstelle von L-Valin enthält, aus der Kultur eliminiert werden, da die stromalen Zellen nicht in der Lage sind, die D-Form der Aminosäure in die essentielle L-Aminosäure zu überführen [Engelmann et al., 2004].

Auch eine kombinierte mechanisch-enzymatische Isolierung cornealer Endothelzellen ist möglich. Stocker beschrieb bereits 1958, dass die Descemet-Membran zusammen mit den cornealen Endothelzellen mit Hilfe von Pinzetten von dem übrigen stromalen Gewebe abgezogen werden kann. Die Explantate aus Descemet-Membran und Endothelzellen

können mit der Endothelseite zuunterst direkt in ein Kulturgefäß überführt werden. Allerdings zeigen die Endothelzellen so ein schlechtes Auswachsen, sodass es mehrere Wochen benötigt, um konfluente Kulturen zu erhalten [Baum et al., 1979]. Bedingt ist dies durch die starke Anhaftung der Endothelzellen an der Descemet-Membran und eine schlechte Adhärenz der Explantate an der Kultivierungsoberfläche [Bednarz et al., 1998]. Durch eine Inkubation mit einer Kombination aus Dispase und Collagenase IV lässt sich der Zellmonolayer hingegen sehr rasch von der Membran lösen, während der alleinige Einsatz eines der Enzyme ineffektiv ist und im Falle der Collagenase IV darüber hinaus zu einem Zellverlust führt [Bednarz et al., 1998]. Trypsin ist zur enzymatischen Isolierung humaner endothelialer Corneazellen nicht optimal geeignet, da die fest an der Descemet-Membran haftenden Endothelzellen durch die erforderliche lange Trypsin-Inkubation eher geschädigt als abgelöst werden können [Engelmann et al., 2004]. Eine erfolgreiche Isolierung boviner und porciner cornealer Endothelzellen ist dennoch mittels Trypsin-Inkubation möglich [Tegtmeyer, 2000; Reichl, 2003].

Humane corneale Endothelzellen, die in vivo keine mitotische Aktivität zeigen, besitzen bei der In-vitro-Kultivierung nach Isolierung aus Spendermaterial eine geringe Proliferationskapazität, wobei sich ein hohes Spenderalter zusätzlich nachteilig auswirkt [Ruberti et al., 2007; Baum et al., 1979]. Während das Wachstum von Endothelzellen isoliert aus Hornhäuten jüngerer Spender mit konventionellen Medien möglich ist, erfordert es den Einsatz optimierter Kulturbedingungen, um Kulturen von Endothelzellen, isoliert aus adulten Corneae, über einen längeren Zeitraum zu etablieren [Engelmann und Friedl, 1995]. Intensive Forschungsarbeit zur Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung humaner cornealer Endothelzellen wurde von der Arbeitsgruppe um Engelmann geleistet [Engelmann et al., 1988, 2001; Engelmann und Friedl, 1989, 1995; Bednarz et al., 1996, 1998, 2001]. Außerdem konnte die Arbeitsgruppe anhand eines In-vitro-Modells eine Technik zur Transplantation kultivierter adulter humaner cornealer Endothelzellen entwickeln [Engelmann et al., 1999a, 1999b; Böhnke et al., 1999].

Die Kultivierung der anspruchsvollen, nativen cornealen Endothelzellen erfolgt zumeist in Basalmedien, denen neben 5-15% Serum diverse Wachstumsfaktoren, Hormone und weitere Supplemente ergänzt werden. Eine Darstellung gebräuchlicher Medien geben Mimura et al. [2013].

Auch von humanen Corneaendothelzellen ist es gelungen, durch Transfektion mit viraler Erbinformation Zelllinien mit ausgedehnter Lebensdauer zu Forschungszwecken zu etablieren [Wilson et al., 1993; Aboalchamat et al., 1999; Bednarz et al., 2000]. Aus der immortalisierten HENC-Zelllinie, die zuvor an serumfreie Kultivierungsbedingungen adaptiert wurde, konnte ein Zellclon isoliert werden, der einige Eigenschaften differenzierter humaner cornealer Endothelzellen exprimiert [Valtink et al., 2008].

Aktuelle Forschungsarbeiten beschäftigen sich u.a. mit der Kultivierung von cornealen Endothelzellen auf Trägern mit thermoresponsiven Oberflächen [Nitschke et al., 2007; Götze et al., 2008]. Diese Oberflächen ermöglichen, die Endothelzellschicht im Ganzen abzulösen, damit diese zukünftig für Transplantationszwecke eingesetzt werden kann [Sumide et al., 2006; Ide et al., 2006; Umemoto et al., 2013; Teichmann et al., 2013].

#### **2.4.4 Organotypische Zellkulturmodelle der Cornea für In-vitro-Anwendungen**

Durch die erfolgreiche Isolierung und Kultivierung der drei cornealen Zelltypen ist ein großer wissenschaftlicher Fortschritt gelungen. Allerdings sind die In-vivo-Bedingungen in der Cornea auf diese Weise nicht ausreichend gut darstellbar, da die Interaktionen zwischen den Zelltypen ausbleiben und die zweidimensionale, durchgehend submerse Kultivierung nicht den im natürlichen Gewebe gegebenen Verhältnissen entspricht.

Geggel et al. konnten bereits 1985 zeigen, dass Collagengele ein geeignetes Wachstumssubstrat für corneale Epithelzellen darstellen, während Doane und Birk beschrieben, dass corneale Fibroblasten, die in eine Collagengelmatrix eingebettet wurden, sich in zueinander orthogonalen Schichten anordnen und damit eine sehr ähnliche Orientierung wie Keratozyten im nativen cornealen Stroma zeigen [1991]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass humane corneale Epithelzellen, die auf Collagengelen kultiviert

wurden, Komponenten der Basalmembran (Laminin, Collagen Typ IV und VII sowie Perlecan) produzieren [Ohji et al., 1994].

Im Folgenden kam es zur Entwicklung verschiedener dreidimensionaler, organotypischer Cornea-Modelle für unterschiedliche Fragestellungen, wie z.B. dem Studium von Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktionen hinsichtlich Proliferation und Differenzierung, der Evaluation des irritativen Potentials von Substanzen und Prozessen der cornealen Wundheilung sowie für Untersuchungen zur transcornealen Arzneistoffpermeation. Das erste dreischichtige Cornea-Modell, das aus bovinen Zellen aufgebaut wurde, wurde von Minami et al. vorgestellt [1993]. In dieser Studie wurde festgestellt, dass nach einem zunächst submersen Wachstum des Cornea-Modells die Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze zu einer deutlichen Förderung von Proliferation und Differenzierung der cornealen Epithelzellen führte. Des Weiteren erwies sich die Co-Kultivierung zusammen mit stromalen und endothelialen Corneazellen als stimulierend für das Wachstum und die Entwicklung der Epithelzellen. Zieske et al. konnten anhand ihres Cornea-Modells aus Kaninchenepithelzellen und -fibroblasten sowie einer kontinuierlichen cornealen Maus-Endothelzelllinie bestätigen, dass das Anheben der Cornea-Modelle an die Luft-Medium-Grenze während der Kultivierungsphase die Differenzierung des Epithels bewirkt und beschrieben darüber hinaus, dass die Anwesenheit von Endothelzellen in dem Modell die Synthese der epithelialen Basalmembran fördert [1994]. Das erste organotypische humane Cornea-Modell, bestehend aus humanen Fibroblasten in einer Collagenmatrix und humanen Epithelzellen isoliert aus der Limbusregion, wurde von Germain et al. vorgestellt [1999]. In dieser Studie konnte ebenfalls die Synthese von Basalmembrankomponenten (Laminin, Fibronectin, Collagen VII und verschiedene Integrinuntereinheiten) nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass die Epithelzellen limbalen Ursprungs über mehrere Passagen in Kultur gehalten werden konnten, während Epithelzellen, die aus der zentralen Cornearegion isoliert wurden, maximal 2-3 Passagen überstanden. Durch die Kultivierung von humanen cornealen Epithelzellen, Keratozyten und Endothelzellen allein sowie Epithelzellen in Kombination mit Endothelzellen oder Keratozyten unter Verwendung von dehydrothermisch vernetzten



Collagenschwämmen als Substrat konnte zum einen gezeigt werden, dass die Keratozyten in die Matrix einwandern, eine flache, langgestreckte Form annehmen und sich, wie in vivo, entlang der Collagenfibrillen anordnen. Zum anderen wurde die Ausprägung der Epithelschicht durch die Gegenwart von Endothelzellen gefördert [Orwin und Hubel, 2000]. Durch den Zusatz von Chondroitinsulfat zum Collagensubstrat konnte in einer weiterführenden Untersuchung die Transparenz des Stromaäquivalentes erhöht werden [Orwin et al., 2003].

Der Aufbau des ersten dreischichtigen humanen Cornea-Modells gelang Griffith et al. [1999]. Diese Arbeitsgruppe stellte ein Konstrukt aufgebaut aus immortalisierten Zelllinien vor, wobei die stromalen Zellen in eine durch Glutaraldehyd quervernetzte Gelmatrix aus Collagen und Chondroitinsulfat eingebettet waren und Epithel- und Endothelzellen auf der Ober- bzw. Unterseite kultiviert wurden. Dieses Modell wies hinsichtlich Morphologie, Transparenz, der Expression biochemischer Marker und Ionentransport Gemeinsamkeiten mit nativem Hornhautgewebe auf. Daher sahen die Autoren zum einen Einsatzmöglichkeiten bei Toxizitätsuntersuchungen und Arzneistofftestungen, zum anderen könne das Modell auch als Basis für einen zukünftigen transplantierbaren Gewebeersatz dienen. Im Folgenden legte die Arbeitsgruppe um May Griffith den Schwerpunkt auf die Entwicklung azellulärer Stromasubstitute, die sowohl das Zellwachstum als auch die Regeneration cornealer Nerven erlaubten und dabei auch eine ausreichende Festigkeit für ein Einnähen in corneales Gewebe aufwiesen [Shimmura et al., 2003; Li et al., 2003; Suuronen et al., 2004; Li et al., 2005]. Nachdem anfänglich Collagen tierischen Ursprungs zum Aufbau der Stromagerüste genutzt wurde, erfolgte bald der Einsatz von rekombinant hergestelltem humanen Collagen [Liu et al., 2006a; Liu et al., 2008; Lagali et al., 2008]. Die zunächst an porcinem Collagen getestete Quervernetzungsmethode mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) wurde auch an rekombinantem humanen Collagen der Typen I und III angewendet, wobei sich der Typ III durch die Ausbildung mechanisch stabilerer Gele auszeichnete, die eine höhere Lichttransmission aufwiesen, bei ansonsten vergleichbaren Eigenschaften hinsichtlich Zell-

und Nervenwachstum [Liu et al., 2006b; Liu et al., 2008; Merret et al., 2008]. Daher wurde ein durch EDC/NHS-Quervernetzung verfestigtes Stromasubstitut aus rekombinantem Collagen Typ III schließlich in einer klinischen Phase-I-Studie getestet, auf die detaillierter in Abschnitt 2.4.5 eingegangen wird [Fagerholm et al., 2010].

Für den Einsatz als In-vitro-Modell für die Evaluation der okularen Toxizität wurde auch ein dreischichtiges Cornea-Modell beschrieben, für das die drei cornealen Zelltypen aus fetalen porcinen Hornhäuten isoliert wurden [Schneider et al., 1997]. Dabei konnte neben der Ausbildung einer epithelialen Basalmembran auch die Ausprägung einer Basalmembran zwischen Stroma und Endothelzellschicht beobachtet werden [Schneider et al., 1999]. Zorn-Kruppa et al. präsentierten ebenfalls ein dreischichtiges Corneaäquivalent, das aus immortalisierten humanen Zelllinien aufgebaut wurde und für die In-vitro-Untersuchung des irritativen Potentials von chemischen Substanzen eingesetzt werden könne [2005].

Neben der Methode des Dispergierens von stromalen cornealen Zellen in einer zugeführten Collagenmatrix besteht die Möglichkeit, die Fibroblasten in vitro zur Sekretion extrazellulärer Matrix zu stimulieren und nach mehrwöchiger Kultivierung ein Stromabioäquivalent zu erhalten [Guo et al., 2007]. Diese Technik wurde von Carrier et al. genutzt, um humane Modelle aus epithelisiertem Stroma für Studien der cornealen epithelialen Wundheilung zu gewinnen [2008, 2009]. Dieses Modell wurde bereits zu einem dreischichtigen humanen Corneaäquivalent weiterentwickelt [Proulx et al., 2010].

Ebenso wie die Testung der In-vitro-Toxizität ist die Untersuchung der Arzneistoffabsorption ins Auge unablässig bei der Entwicklung von neuen Wirkstoffen oder neuen Formulierungen bekannter Wirkstoffe zur Anwendung am Auge. Da der wesentliche Aufnahmeweg von topisch am Auge applizierten Substanzen die Route über die Hornhaut ist, wird die Entwicklung von Cornea-Modellen für In-vitro-Arzneistoffabsorptionsuntersuchungen vorangetrieben, die die in vivo gegebenen Barriereigenschaften von hydrophilen und lipophilen Abschnitten möglichst präzise nachstellen. Zu diesem Zwecke konnten Tegtmeyer et al. ein Modell entwickeln, das aus primären Kulturen boviner cornealer Epithel-, Stroma- und Endothelzellen generiert wurde [2001, 2004]. Reichl et al. konnten die dargestellten

Methoden nutzen, um zunächst ein porcines und später ein dreischichtiges humanes Modell der Cornea für Permeationsuntersuchungen zu entwickeln, das entsprechende Barriereigenschaften wie exzidiertes humanes Gewebe exprimiert [Reichl und Müller-Goymann, 2001; Reichl, 2003; Reichl et al., 2003, 2004, 2005]. Die Einsatzmöglichkeit dieses Cornea-Modells konnte auf Zytotoxizitätsuntersuchungen ausgeweitet werden [Döhring, 2009]. Um die Standardisierung dieses Modells weiter zu erhöhen, wurde das humane Permeationsmodell kürzlich an die Kultivierung unter serumfreien Bedingungen bei der Verwendung humaner immortalisierter Zelllinien angepasst, wobei die Struktur auf ein Hemicornea-Modell aus Epithel und Stroma reduziert wurde [Hahne und Reichl, 2011; Hahne et al., 2012]. Ein verwandtes, serumfrei kultiviertes Hemicornea-Modell kann Einsatz finden bei der Testung von chemischen Substanzen hinsichtlich des irritativen Potenzials am Auge [Engelke et al., 2013].

Die Thematik der zellkulturbasierten Cornea-Modelle für In-vitro-Arzneistoffabsorptionsuntersuchungen wird im ersten experimentellen Teil dieser Arbeit aufgegriffen.

#### **2.4.5 Zellkulturen in der regenerativen Ophthalmologie**

Für die Unterstützung der Abheilung persistierender oder progredienter Epitheldefekte der Hornhaut oder auch der Conjunctiva wird häufig Amnionmembran eingesetzt, die die innerste Membran der Fruchtblase darstellt [Kruse und Meller, 2001; Fernandes et al., 2005; Meller et al., 2011]. Die Amnionmembran kann dabei als transferable Abdeckung zum mechanischen Schutz des regenerierenden Epithels (Onlay oder Patch) verwendet werden oder bei nicht penetrierenden cornealen Substanzdefekten als Transplantat fungieren, das in den Hornhautdefekt eingebracht wird, um diesen aufzufüllen (Inlay oder Graft). Häufig wird auch eine Kombination aus Patch- und Graftverfahren, die als Sandwichtechnik bezeichnet wird, angewendet [Mueller, 2008; Meller et al., 2011]. Kürzlich wurde auch ein Verfahren für eine nahtlose Transplantation der Amnionmembran zur Förderung der Reepithelisierung entwickelt, bei dem das Gewebe in eine Ringkonstruktion eingespannt wird und ähnlich einer Kontaktlinse auf die Augenoberfläche gesetzt wird [Engelmann et al., 2013]. Darüber hinaus

findet die Amnionmembran in jüngerer Zeit Anwendung zur Behandlung der limbalen Stammzellinsuffizienz [Tseng et al., 1998]. Sie dient dabei als Zellsubstrat für die Ex-vivo-Expansion cornealer limbalen Stammzellen, das nach Abschluss der Kultivierungsphase zusammen mit den Epithelzellen in das corneale Gewebe transplantiert wird [Dua et al., 2004; Fernandes et al., 2005; Kruse und Cursiefen, 2008; Meller et al., 2011, 2012].

Amnionmembran weist eine vorteilhafte zellwachstumsstimulierende, antientzündliche, antiangiogenetische sowie antimikrobielle Wirkung auf und reduziert die Narbenbildung [Fernandes et al., 2005]. Als Nachteile sind allerdings auch die schlechte Standardisierbarkeit des biologischen Materials, die zu variierenden klinischen Ergebnissen führt, die Gefahr einer Infektionsübertragung von Spender auf Empfänger, die geringe mechanische Stabilität und die rasche Degradation nach Transplantation zu nennen sowie die deutlich eingeschränkte Transparenz, wodurch postoperativ die Sehfunktion eingeschränkt wird [Chen et al., 2012; Dravida et al., 2008; Ma et al., 2010; Ijiri et al., 2007]. Außerdem erfordert die Gewinnung und Herstellung von kryokonservierter, humaner Amnionmembran aus Spenderplazenta seitens der Gewebebank ein großes Maß an Organisationsstruktur und einen hohen Dokumentationsaufwand hinsichtlich der zugrunde zu legenden Arbeitsrichtlinien [Hahn et al., 2010].

Als Alternativen zur Amnionmembran werden derzeit verschiedene Materialien hinsichtlich ihrer Eignung als Zellträger untersucht. Mit Fibringelen [Han et al., 2002; Talbot et al., 2006; Rama et al., 2001, 2010], die aus Fibrinogen und Thrombin hergestellt wurden, und Collagen-basierten Zellträgern, deren Festigkeit durch chemische Quervernetzung [Dravida et al., 2008; Liu et al., 2012a, 2013] oder plastische Kompression [Mi et al., 2010; Levis et al., 2010, 2013; Xiao et al., 2014] erhöht wurde, konnten bisher aussichtsreiche Ergebnisse erzielt werden. Für Fibringele als Trägermaterial limbalen Stammzellen liegen bereits Daten aus In-vivo-Testungen vor [Talbot et al., 2006; Rama et al., 2001, 2010]. Weitere Materialien, die sich in der In-vitro-Testung befinden, sind z.B. Keratin [Reichl, 2009; Reichl et al., 2011; Borelli et al., 2013], Seidenprotein [Lawrence et al., 2009; Higa et al., 2011; Liu et al., 2012b] oder Linsenkapselformat [Galal et al., 2007].

Des Weiteren wurden durch die Kultivierung limbalen Stammzellen auf thermoresponsiven Oberflächen trägerfreie Epithelzellschichten erhalten, die in einem In-vivo-Kaninchen-Modell erfolgreich auf die Augenoberfläche transplantiert werden konnten [Nishida, 2003; Nishida et al., 2004]. Diese Technik wird auch für die Erzeugung endothelialer Zellschichten angewendet, die zukünftig für Transplantationen eingesetzt werden sollen [Sumide et al., 2006; Ide et al., 2006; Umemoto et al., 2013; Teichmann et al., 2013]. Plastisch komprimierte Collagengele werden ebenfalls hinsichtlich ihrer Eignung als Träger für ex vivo expandierte humane corneale Endothelzellen untersucht [Levis et al., 2012]. Auch Amnionmembran konnte sich als geeigneter Träger humaner cornealer Endothelzellen bei der Transplantation in Kaninchen erweisen [Ishino et al., 2004].

Für die Therapie schwerwiegender Hornhautdefekte wird eine Transplantation von humanem Spenderhornhautgewebe in Form einer lamellären oder perforierenden Keratoplastik durchgeführt, um die Sehfähigkeit wiederherzustellen. Als limitierender Faktor steht hierbei neben der Gefahr der Transplantatabstoßung vor allem die sehr begrenzte Verfügbarkeit von geeignetem Spendermaterial im Vordergrund. Obwohl die unter 2.4.4 aufgeführten organotypischen Zellkulturmodelle der Cornea für In-vitro-Anwendungen ihren Nutzen für Studien der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Wundheilung sowie als Modelle zur Untersuchung der In-vitro-Toxizität und der In-vitro-Arzneistoffabsorption entfalten können, sind sie als regenerativer Cornea-Ersatz nicht einsetzbar, weil sie eine völlig ungeordnete Verteilung der Collagenfibrillen aufweisen und von äußerst geringer mechanischer Belastbarkeit sind [Ruberti und Zieske, 2008]. Neben der diffizilen Kultivierung und Expansion nativer humaner cornealer Endothelzellen ex vivo stellt insbesondere die In-vitro-Rekonstruktion des Stromagewebes aufgrund seiner sehr speziellen strukturellen Organisation, die essentiell für seine Funktionalität ist hinsichtlich Transparenz und mechanischer Festigkeit, immer noch eine große Herausforderung dar. Es werden derzeit verschiedene Ansätze verfolgt, die darauf basieren, dass zunächst ein azelluläres Gerüst hergestellt wird, das in einem zweiten Schritt von cornealen Zellen besiedelt werden soll, wie z. B. die Verwendung von dezellularisierter, tierischer, meist porciner Cornea [Lynch und

Ahearne, 2013], quervernetzten Gelatine-Chondroitinsulfat-Gerüsten [Lai et al., 2012] oder die Rekonstruktion einer transparenten Collagenmatrix. Bisher ist es aber nicht gelungen, in vitro einen transplantierbaren Cornea-Ersatz aus Epithel, Stroma und Endothel zu generieren.

Der bisher aussichtsreichste Ansatz zur Rekonstruktion der Stromabiomatrix stammt aus der Arbeitsgruppe um May Griffith. Die Arbeitsgruppe konnte durch Quervernetzung von humanem rekombinanten Collagen Typ III mit 1-Ethyl-3-(3-diaminopropyl)carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) ein transparentes, azelluläres Stromasubstitut mit ausreichender biomechanischer Festigkeit erzeugen. Nach erfolgreicher Implantation in Schweinecorneae folgte eine Phase 1-Studie an 10 Patienten mit einem zunächst 24-monatigen Follow-up [Merret et al., 2008; Fagerholm et al., 2010]. Die 500 µm dicken Stromasubstitute wurden dabei als anteriore lamelläre Keratoplastik implantiert. Es wurden weder Abstoßungsreaktionen noch schwere Komplikationen beobachtet. Die Transplantate wurden gut vertragen, und eine Regeneration der Innervation, des Tränenfilms und des Epithels konnte erreicht werden, wenn auch zu Beginn gestört durch die für 6-7 Wochen verbleibenden Nähte. Allerdings verblieben lokale Trübungen an den Stellen initial gestörter Epithelisierung, und die Remodellierung der Implantate in vivo war sehr unterschiedlich, sodass nach 24 Monaten die Dicke der Substitute von 211-550 µm variierte. Auch die Verbesserung der Sehkraft blieb deutlich hinter der durch Transplantation einer Spendercornea erreichbaren zurück. Die kürzlich publizierten Ergebnisse des 4-Jahres-Follow-ups zeigen, dass die Stromasubstitute weiterhin stabil sind, bisher keinerlei Abstoßungsreaktionen aufgetreten sind und dass die Regenerierung der Innervation und die Repopulation des Substituts durch stromale Zellen weiter fortschreiten, wenngleich auch nach 4 Jahren noch zentrale zellfreie Bereiche vorhanden sind [Fagerholm et al., 2014]. Die Weiterentwicklung dieser transplantierbaren Stromasubstitute hin zu einem vollständigen Cornea-Ersatz soll zukünftig durch die Verwendung einer EDC/NHS-quervernetzten Collagen-Phosphorylcholin-Matrix gelingen, da diese bereits im Tiermodell getestet

Substitute stabiler sind und sich durch eine höhere Resistenz gegen enzymatischen Abbau auszeichnen [Liu et al., 2009; McLaughlin et al., 2010].

Ein weiterer vielversprechender Ansatz für die Rekonstruktion der Stroma-Biomatrix ist die Stimulation von humanen cornealen stromalen Zellen zur Sekretion extrazellulärer Matrix. Vorteil eines solchen in vitro erzeugten Gewebeersatzes wäre es, dass es aus dem jeweiligen Zellmaterial des Empfängers gezüchtet werden könnte, sodass mögliche Abstoßungsreaktionen des Spendergewebes sowie das Risiko einer Infektionsübertragung vom Spender auf den Empfänger ausbleiben würden. Durch Supplementierung der Kulturen mit Vitamin C kann sehr effektiv eine Stimulation der Synthese collagenhaltiger extrazellulärer Matrix erfolgen, weil Vitamin C ein essentieller Co-Faktor für die Hydroxylierung von Prolin zu Hydroxyprolin ist [Newsome et al., 1974; Stoesser et al., 1978; Ruggiero et al., 1996; Guo et al., 2007; Stryer, 1996]. Diese Aminosäure ist zusammen mit Glycin und Prolin zu einem sehr hohen Anteil im Collagenmolekül enthalten, das eine enggewundene  $\alpha$ -Helix von drei helikalen Collagenpeptidsträngen darstellt [Stryer, 1996]. Die durch Vitamin C-Supplementierung des Mediums erhaltenen Zellkulturen ähneln der Matrix, die in vivo während der cornealen Entwicklung auftritt und werden deshalb als vielversprechender Ansatz für die In-vitro-Generierung stromalen Gewebes betrachtet [Cintron et al., 1983; Ruberti und Zieske, 2008]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass auf diese Weise erzeugte stromale Gewebeschichten die Anheftung und das Wachstum sowohl cornealer Epithel- als auch Endothelzellen erlauben [Proulx et al., 2010].

Die Thematik der Stimulation der Collagensynthese in cornealen stromalen Zellen wird im zweiten experimentellen Teil dieser Arbeit aufgegriffen.

## **2.5 Einsatz zellulärer Assays zur Untersuchung des Status von Zellkulturen**

Zelluläre Assays werden vielfach eingesetzt, um den Zustand oder den Stoffwechselstatus von Zellkulturen zu analysieren. Dabei kann das unbeeinflusste Wachstumsverhalten der Zellen oder aber der Einfluss des Einwirkens bestimmter Noxen betrachtet werden, z.B. hinsichtlich eines zytotoxischen Effektes oder der Auslösung apoptotischer Vorgänge. Für die Detektion bzw. die Quantifizierung der zellulären Ereignisse bedient man sich häufig einer Absorptionsmessung im UV-VIS-Bereich, der Bildung eines Fluorophors oder aber einer Chemilumineszenzreaktion. Eine Fluoreszenzmessung ist einer Absorptionsmessung hinsichtlich Selektivität und Sensitivität überlegen. Bei der Fluoreszenz, die neben der Phosphoreszenz zur Photolumineszenz zählt, wird zunächst durch Absorption von Licht ein energiereicher Zustand von Atomen oder Molekülen erzeugt. Bei Rückkehr in den Grundzustand werden energieärmere Lichtquanten einer höheren Wellenlänge emittiert [Fan und Wood, 2007]. Apparativ muss daher durch optische Filter und eine entsprechende geometrische Anordnung zwischen dem energiereichen Anregungslicht und dem energieärmeren Emissionslicht diskriminiert werden. Dennoch tritt bei einer Fluoreszenzmessung ein höherer Messhintergrund auf als bei einer Chemilumineszenzmessung [Promega Corporation, 2011]. Im Unterschied zur Fluoreszenz wird bei der Chemilumineszenz der energiereiche Zustand durch eine exotherme chemische Reaktion erzeugt. Da Stoffe, die Chemilumineszenzreaktionen eingehen können, vergleichsweise selten auftreten, besitzt diese Messtechnik eine hohe Selektivität. Wegen der praktisch nicht vorhandenen Hintergrundlumineszenz zeichnet sich die Detektion über eine Chemilumineszenzreaktion über eine hohe, der Fluoreszenz überlegene Sensitivität aus [Fan und Wood, 2007]. Die Biolumineszenz ist ein Spezialfall der Chemilumineszenz, bei der in der belebten Natur vorhandene Enzyme und Cofaktoren bei der lichterzeugenden Reaktion eine essentielle Rolle spielen [Albrecht et al., 2005]. Die beteiligten Enzyme werden als Luciferasen und die photonemittierenden Substrate als Luciferine bezeichnet [Fan und



Wood, 2007]. Im Folgenden wird die Chemilumineszenz bzw. die Biolumineszenz kurz als Lumineszenz bezeichnet.

Im Rahmen des Multiplexings können auch mehrere Detektionsmöglichkeiten genutzt werden, um parallel, ggf. nach Trennung von Zellüberstand und Zellrasen, verschiedene zelluläre Ereignisse zu betrachten. Die Auswahl eines geeigneten Zellassays sollte daher unter Berücksichtigung der Zielgröße, der Anwesenheit möglicher Störfaktoren, der Eignung für ein eventuelles Multiplexing, der Verfügbarkeit entsprechender Messtechnik sowie der Kosten erfolgen.

Im Folgenden wird auf verschiedene Möglichkeiten zur Bestimmung der Zellviabilität sowie zur Untersuchung apoptotischer und zytotoxischer Prozesse eingegangen. Zunächst werden jedoch diese möglichen Zustände der Zellkulturen näher erläutert. Es sei allerdings darauf hingewiesen, dass die im Folgenden erläuterten Formen des Zelltods, Apoptose und Nekrose, keine starren Phänomene sind, sondern Extremformen, zwischen denen es fließende Übergänge gibt [Hug, 2000].

### **2.5.1 Zellviabilität**

Die Zellviabilität beschreibt die Stoffwechselleistung einer Zellkultur und ist somit ein Maß für ihre Lebensfähigkeit. Für die Quantifizierung bedient man sich häufig der in vitalen Zellen im Rahmen des Zellstoffwechsels entstehenden Reduktionsäquivalente, die in der Detektionsreaktion des Assays die Umsetzung des Agens bewirken.

Von dem Begriff der Viabilität ist der Begriff der Zellproliferation abzugrenzen. Dieser bezeichnet die Zellvermehrung innerhalb einer Kultur. Die Zellproliferation kann beispielsweise über eine Zellzählung sowie über die Bestimmung der DNA-Menge oder des Proteingehalts über den Verlauf der Kultivierung ermittelt werden. Bei adhärent wachsenden Zellkulturen, die sich noch nicht in einem konfluenten Zustand befinden, kann die Zellproliferation außerdem über die Messung der Zellviabilität erfolgen, da in diesem Kultivierungsstadium die Zunahme der Zellzahl und die Steigerung der Stoffwechselleistung parallel verlaufen. Beim Übergang in den konfluenten Kultivierungszustand ist allerdings

der parallele Verlauf von Zellproliferation und Zellviabilität nicht mehr gegeben. Hierbei tritt eine Hemmung der Zellteilung ein, die bewirkt, dass die Zellzahl annähernd konstant bleibt. Im gleichen Zuge sinkt die Stoffwechselleistung ab, da keine weiteren Energieressourcen für mitotische Prozesse benötigt werden. Ein Viabilitätsassay kann demnach im konfluenten Zustand einer adhärennten Zellkultur nicht als Maß für die Zellproliferation herangezogen werden.

### **2.5.2 Zelltod durch Apoptose**

Bei der Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, handelt es sich um einen physiologischen, streng kontrollierten Prozess, der einzelne Zellen zum Wohle des Gesamtorganismus eliminiert. Bei diesem „Todesprogramm“ werden unter ATP-Verbrauch DNA-Stränge fragmentiert, cytosolische Proteine quervernetzt und das Cytoskelett zerstört (Abbildung 2.4). Dieser Prozess bedingt, dass sich die Zelle unter Schrumpfung aus dem Zellverband löst [Thews et al., 1999]. Die dabei entstehenden Fragmente werden als Apoptosekörper bezeichnet. Diese sind noch von einer Zellmembran umgeben, sodass der Zellinhalt, z.B. lysosomale Enzyme, nicht an die Umgebung abgegeben wird. Die Apoptosekörper werden in vivo rasch von Makrophagen aufgenommen [Grimm, 2003]. Eine Aktivierung der Makrophagen nach der Phagozytose bleibt bei der Apoptose in der Regel aus, sodass die Apoptose unauffällig und ohne Entzündung verläuft [Köhler et al., 2001]. Morphologische Merkmale eines apoptotischen Zellsterbens sind die Zunahme der optischen Dichte der Zelle infolge des Zusammenziehens der Zellmembran unter Wasserverlust, wodurch in Apoptose befindliche Zellen im Phasenkontrastmikroskop als hell leuchtende Objekte erscheinen. Durch den Abbau des Cytoskeletts bilden sich Blasen in der Zellmembran, die schließlich in der Abschnürung der Apoptosekörper münden [Grimm, 2003]. Zu den membranären Veränderungen zählt ebenfalls die Umlagerung von Phosphatidylserin von der Membraninnenseite auf die extrazelluläre Seite, die von Phagozyten erkannt wird [Höffeler, 2004; Hug, 2000]. Gleichzeitig sind frühe Veränderungen des Zellkerns mit Kondensation des Chromatins, gefolgt von der Verdichtung und

Schrumpfung des ganzen Zellkerns sowie schließlich dessen Auflösung zu beobachten [Wachtler, 2005]. Dabei wird die DNA durch spezifische Endonukleasen zwischen den Histonen geschnitten. Die potentiellen Schnittstellen liegen jeweils im Abstand von etwa 180-200 Basenpaaren, sodass DNA-Bruchstücke entstehen, die in ihrer Länge Vielfachen von 180-200 Basenpaaren entsprechen [Collins et al., 1997; Hug, 2000].

Eine Zelle geht in die Apoptose über, wenn positive Signale wie Wachstumsfaktoren oder Hormone, die durch den Kontakt mit Nachbarzellen vermittelt werden, entzogen werden, oder wenn ihr ein internes oder externes negatives Signal zur Apoptose übermittelt wird [Stephan et al., 2000]. Die physiologische Apoptose ist durch die genetisch festgelegte Lebensspanne einer Zelle determiniert. Die Funktionalität vieler Gewebe wird durch das apoptotische Sterben von Zellen und deren Ersatz durch Mitosen aufrechterhalten. Auch bei der Embryonalentwicklung spielen apoptotische Vorgänge eine wichtige Rolle bei der Modellierung der späteren Gestalt. Allerdings können auch nicht physiologische Noxen wie Hitze, radioaktive und UV- oder Röntgenstrahlung, chemische Substanzen sowie Mikroorganismen nicht nur eine Nekrose bedingen, sondern auch Apoptose induzieren [Wachtler, 2005; Stephan et al., 2000].

Eine wesentliche funktionelle Rolle im Ablauf des Apoptoseprogramms spielt eine Gruppe von Proteasen, die die Aminosäure Cystein im aktiven Zentrum tragen und Peptidbindungen C-terminal von Asparaginsäure hydrolysieren. Diese Cysteiny-Aspartat-spezifischen Proteasen, kurz Caspasen, liegen intrazellulär als Procaspasen vor, die inaktive Vorstufen darstellen. Sogenannte Initiatorcaspasen können über zwei verschiedene Wege aktiviert werden, den extrinsischen und den intrinsischen Weg, und leiten dann über eine kaskadenartige Aktivierung weiterer Caspasen den apoptotischen Zelltod ein. Bei der Initiierung über den extrinsischen Weg binden extrazellulär Liganden, z.B. Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) oder Apoptoseantigen 1 (APO-1 oder Fas), das auch als CD 95 (cluster of differentiation 95)-Ligand bezeichnet wird, an Todesrezeptoren. Infolge der Trimerisierung von Todesrezeptoren wird intrazellulär die Procaspase 8 aktiviert. Durch die Initiatorcaspase 8 werden dann wiederum die Procaspasen 3 und 6 zu ihrer aktiven Form

gespalten. Der intrinsische Weg der Apoptoseeinleitung führt über einen Ausstrom von proapoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien, u.a. Cytochrom C, bedingt durch eine geschädigte Membranregulation [Höffeler, 2004]. Cytochrom C bildet dann mit dem cytosolischen Apaf-1 und Procaspase 9 das heptamere Apoptosom aus, an dem die Procaspasemoleküle durch die räumliche Nähe zueinander autoaktiviert werden. Die aktivierte Initiatorcaspase 9 führt dann ihrerseits zur Mobilisierung der Effektorcaspase 3, die wiederum weitere Procaspasen in ihre aktive Form umsetzt. Die Effektorcaspasen bedingen direkt oder indirekt über Nukleasen oder Proteine wie AIF (Apoptose induzierender Faktor) eine Fragmentierung der Zellbestandteile und die apoptosetypischen morphologischen Veränderungen, wobei die Caspase 3 das größte Wirkungsspektrum aufweist. Beide Initiationswege der Apoptose sind nicht ohne Berührungspunkte. Proapoptotische Regulatorproteine, die sowohl über den intrinsischen als auch über den extrinsischen Weg stimuliert werden können, wirken weiter auf die Regulation der Mitochondrienmembran ein, wodurch sich beide Wege überschneiden und verstärken können. Außerdem ist die Caspasekaskade eine komplexe Struktur, innerhalb derer zwischen verschiedenen Caspasen Mechanismen aus Aktivierung und Rückkopplung bestehen [Höffeler, 2004].

Neben dem intrinsischen und dem extrinsischen Weg der Apoptoseeinleitung sind weitere Auslöser der Apoptose möglich. So kann es unter Stressbedingungen im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums zur Aktivierung dort vorhandener Caspasen kommen, u.a. Caspase 12, die dann auf einem bisher nicht bekannten Wege über die Bildung von Apoptosomen die Procaspase 9 aktivieren. Granzyme B aus zytotoxischen T-Lymphozyten kann in der Zielzelle durch Spaltung der Procaspasen 3 und 7 sehr effektiv Apoptose auslösen. Ebenso kann eine DNA-Schädigung im Zellkern über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors und Tumorsuppressors p53, der wiederum mit Proteinen interagiert, die bestimmte Membrankanäle regulieren, den Ausstrom von Cytochrom C induzieren [Höffeler, 2004; Grimm, 2003].

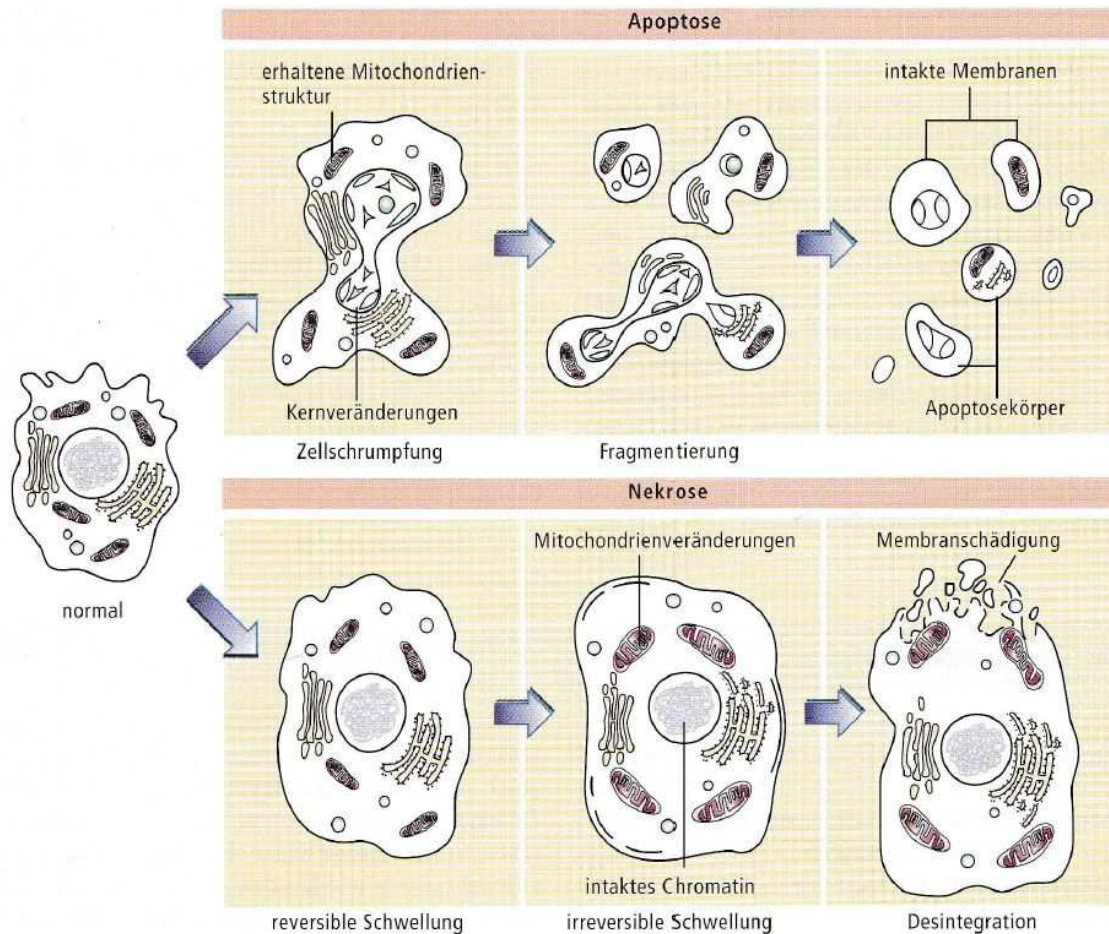


Abbildung 2.4: Morphologische Merkmale bei Apoptose und Nekrose (aus Thews et al., 1999).

### 2.5.3 Zelltod durch Nekrose

Statt eines apoptotischen Zelltods kann eine Zelle auch durch die sogenannte Nekrose zugrunde gehen. Bei der Nekrose handelt es sich um einen durch eine Zellschädigung bedingten und damit pathologischen Zelltod. Bei Einwirkung einer schädigenden Noxe, die ein bestimmtes Maß überschreitet, sodass eine vollständige Wiederherstellung nicht möglich ist, kommt es zu irreversiblen Zellveränderungen und schließlich zum Zelluntergang [Thews et al., 1999]. Dabei steht eine Schädigung der Zellmembran und der intracytoplasmatischen Membranen im Vordergrund, wodurch es zu Störungen des osmotischen Gleichgewichts zwischen dem Zellinnern und der Umgebung kommt [Wachtler, 2005]. Morphologische Zeichen einer Nekrose sind Vesikelbildungen im Cytoplasma, Anschwellen der

Mitochondrien, Anschwellen und Auflösung der Lysosomen und schließlich die Auflösung des Cytoplasmas (Abbildung 2.4). Der Zellkern schwillt an und löst sich in späteren Stadien der Nekrose auf. Die Überreste der nekrotischen Zellen werden schließlich von Makrophagen eliminiert. Durch die Freisetzung von normalerweise nur intrazellulär vorkommenden Enzymen und Faktoren in die Umgebung kann, bei entsprechend großer Menge, der Gesamtorganismus geschädigt werden [Wachtler, 2005].

Neben einer rein mechanischen Schädigung gibt es diverse Noxen, die einen zytotoxischen Effekt haben und damit einen nekrotischen Zelltod induzieren können, so z.B. Hitzeschock, Sauerstoffmangel, oxidativer Stress, Strahlung, Mikroorganismen oder diverse chemische Substanzen [Leist und Nicotera, 1997; Stephan et al., 2000].

#### **2.5.4 Zellassays**

Im Folgenden werden gängige Methoden zur Bestimmung zellulärer Ereignisse in Zellkulturen erläutert. Dabei wird auf das Prinzip der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten zellulären Assays detailliert eingegangen.

##### **2.5.4.1 Viabilitätsassays**

Bei der Bestimmung der Zellviabilität mittels Zellassays werden häufig die im Rahmen des Zellstoffwechsels gebildeten Reduktionsäquivalente Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid (NADH) und Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) herangezogen, die im Verlauf der Detektionsreaktion des Assays selbst oxidiert werden. Vielfachen Einsatz findet der MTT-Assay. Dieser wurde bereits 1983 von Mosmann zur Bestimmung der Zellproliferation, Überlebensrate und Aktivierung von Zellkulturen sowie zur Untersuchung zytotoxischer Effekte etabliert [Mosmann, 1983]. Er beruht auf der Verwendung des Tetrazoliumsalzes MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) als Substrat. Dieses wasserlösliche, gelb gefärbte Salz wird während der vierstündigen Inkubation in

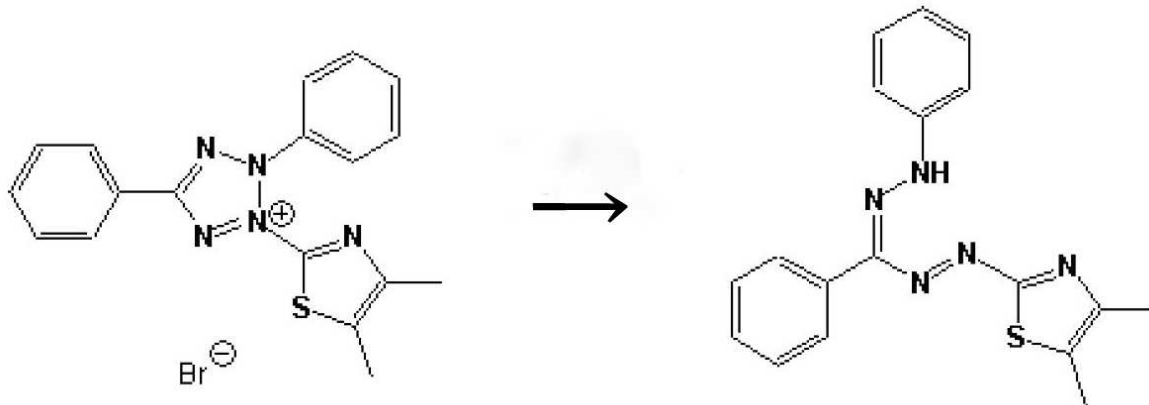


Abbildung 2.5: Reduktion des wasserlöslichen, gelb gefärbten 3-(4,5-Dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid zum wasserunlöslichen, blauviolett gefärbten, ringoffenen Formazan.

lebenden Säugerzellen durch Einwirkung der oben genannten Reduktionsäquivalente unter Katalyse mikrosomaler Enzyme oder Enzymen der äußeren Mitochondrienmembran umgesetzt [Berridge und Tan, 1993]. Während NADH als Elektronendonator zu 56% an der Umsetzung des Tetrazoliumsalzes beteiligt ist, spielt die Reduktion des MTT durch die Succinatdehydrogenase des mitochondrialen Komplex II der Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran, der in früheren Publikationen eine große Rolle beigemessen wurde, mit weniger als 10% nur eine untergeordnete Rolle [Berridge und Tan, 1993]. Die Metabolisierung des MTT ist somit ein Maß für die Glykolyserate der Kultur und weniger des Ausmaßes der Zellatmung [Berridge et al., 1995, 1996]. Die Reduktion des Tetrazoliumsalzes erfolgt unter Ringöffnung zu einem blauviolett gefärbten, wasserunlöslichen Formazan (Abbildung 2.5) [Slater et al., 1963; Freshney, 2005]. Um das gebildete Formazan, das intrazellulär in Kristallen ausfällt, zu lösen und der Detektion zugänglich zu machen, muss beim MTT-Assay eine Zelllyse erfolgen. Dafür hat sich der Einsatz einer salzsauren, isopropanolischen Lösung als vorteilhaft erwiesen [Mosmann, 1983]. Zur Unterstützung der Zelllyse wird vielfach zusätzlich ein Tensid eingesetzt. Alternativ kann die Extraktion der MTT-Formazankristalle auch mit dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) erfolgen [Freshney, 2005]. Da das Reaktionsprodukt

ein anderes Absorptionsmaximum als das Substrat aufweist, ist diese Umsetzung über eine UV-VIS-Messung quantifizierbar. Die kolorimetrische Messung erfolgt bei 570 nm im Bereich des Absorptionsmaximums des gebildeten Formazans. Bei dieser Wellenlänge haben das Substrat MTT und verbleibende Zelltrümmer keinen störenden Einfluss [Mosmann, 1983]. Als Weiterentwicklung des MTT wurden neuere Tetrazoliumsalze eingeführt, wie z.B. MTS (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; Owens Reagenz), XTT (2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid) und WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzoldisulfonat). Sie zeichnen sich im Wesentlichen dadurch aus, dass sie in Gegenwart eines intermediären Elektronenakzeptors (z.B. Phenazinmethosulfat) zu wasserlöslichen Formazanen umgesetzt werden. Daher kann der für den MTT-Assay erforderliche Schritt der Zelllyse entfallen, wodurch sich die neueren Substanzen im Besonderen für ein Assay-Multiplexing anbieten, um zeitgleich mehrere zelluläre Ereignisse zu erfassen [Berridge et al., 1996; Gaunitz und Heise, 2003]. Für XTT und WST-1 ist allerdings zu beachten, dass die Reduktion durch NADH und NADPH auch auf rein biochemischem Wege ohne eine enzymatische Katalyse erfolgen kann, sodass eine Kombination mit einem Assay, der NADH oder NADPH als Cofaktor enthält, die Ergebnisse des Viabilitätstests verfälschen würde. Von einer Anwendung bei Gegenwart von reduzierenden Agenzien wie z.B. L-Cystein, L-Ascorbinsäure oder Mercaptoethanol ist ebenfalls abzuraten. Von Vorteil ist, dass die Umsetzungsreaktion bei XTT und WST-1 bereits nach wenigen Minuten einsetzt und damit wesentlich rascher als bei MTT, sodass auch zelluläre Ereignisse in einem deutlich kürzeren Inkubationsfenster betrachtet werden können. Die Reduktion von XTT und WST-1 durch NADH oder NADPH kann auch unter Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies stattfinden. Diese Reaktion erfolgt in Gegenwart von Zellen an der Plasmamembran oder extrazellulär [Berridge et al., 1996; Berridge und Tan, 1998]. Durch die nicht identische Assaychemie können die Resultate des Prototyps MTT und die der Tetrazoliumsalze der neuen Generation nicht ohne weiteres miteinander verglichen werden.



Der Farbstoff Resazurin, auch Alamar Blue genannt, kann ebenfalls zur Bestimmung der Zellviabilität eingesetzt werden. Der blaue, nicht fluoreszierende Farbstoff wird in Gegenwart vitaler Zellen unter Beteiligung von Reduktionsäquivalenten zu dem violetten, stark fluoreszierenden Resorufin umgesetzt. Diese Reduktionsreaktion kann durch mitochondriale, cytosolische und mikrosomale Enzyme katalysiert werden [O'Brien et al., 2000; Gonzalez und Tarloff, 2001]. Die Detektion kann sowohl über eine kolorimetrische als auch über eine fluorimetrische Messung erfolgen. Da das Reaktionsprodukt Resorufin wasserlöslich ist, ist auch bei diesem Assay keine Zelllyse erforderlich, sodass der Einsatz im Rahmen eines Assay-Multiplexings möglich ist [O'Brien et al., 2000; Gaunitz und Heise, 2003]. Ein weiterer Vorteil gegenüber MTT ist, dass Resazurin nicht toxisch auf Zellen wirkt. Allerdings kann durch metabolisch aktive Zellen eine weitere Reduktion des pink gefärbten, fluoreszierenden Resorufins zu dem nicht fluoreszierenden, farblosen Hydroresorufin erfolgen, wodurch die Zellviabilität falsch zu niedrig gemessen werden würde [O'Brien et al., 2000].

Ein weiteres mögliches Target bei der Untersuchung der Zellviabilität ist das intrazelluläre Level von Adenosintriphosphat (ATP). ATP als zentraler Energieträger ist ein Maß für die Stoffwechselleistung der Zelle. Da der intrazelluläre ATP-Gehalt in geschädigten Zellen rasch abnimmt, besteht eine strenge Korrelation zwischen dem ATP-Level und der Zellviabilität [Maehara et al., 1987; Crouch et al., 1993; Petty et al., 1995]. Die Detektion des ATP erfolgt über die Luciferin-Luciferase-Reaktion. Damit ATP mit den Assayreagenzien interagieren kann, ist zunächst eine Lyse der Zellen erforderlich [Promega Corporation, 2008a]. In Gegenwart von Magnesium ist ATP dann an der enzymatischen Umsetzung des Substrates Luciferin mittels des ebenfalls zugesetzten Enzyms Luciferase beteiligt. Unter Abspaltung von Pyrophosphat entsteht als Intermediat zunächst das enzymgebundene Luciferyl-Adenosinmonophosphat. Dieses bildet dann mit Sauerstoff das enzymgebundene Oxiluciferin in einem angeregten Energiezustand. Bei Rückkehr in den relaxierten Zustand wird gelb-grünes Licht mit einem Spektralmaximum von 560 nm emittiert [Fan und Wood, 2007]. Zur Quantifizierung der Zellviabilität werden die emittierten Lichtquanten mit einem Luminometer über einen definierten Zeitraum erfasst. Historisch

wurde die Luciferase für ATP-Assays aus Leuchtkäfern (*Photinus pyralis*) isoliert. Wegen der bedingten Stabilität in vitro und der Sensitivität gegenüber den Umgebungsbedingungen, wie z.B. pH-Wert und Gegenwart von Detergenzien, ist heutzutage in kommerziell erhältlichen Assays der Einsatz von rekombinant hergestellter, modifizierter Leuchtkäfer-Luciferase verbreitet [Promega Corporation, 2008a].

Im Vergleich zum klassischen MTT-Test ist bei Bestimmung der Zellviabilität über einen ATP-Lumineszenzassay das Ergebnis durch die wesentlich kürzere Inkubationszeit im Minutenbereich deutlich schneller verfügbar. Des Weiteren ist ein ATP-Lumineszenzassay weniger störanfällig gegenüber anderen Agenzien und deutlich sensibler, da die praktisch nicht vorhandene Hintergrundlumineszenz ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis ermöglicht, sodass auch eine geringe Anzahl von Zellen betrachtet werden kann [Petty et al., 1995; Fan und Wood, 2007].

Andere Möglichkeiten zur Bestimmung der Stoffwechselleistung einer Zellkultur sind z.B. die Messung der Aktivität bestimmter Proteasen in vitalen Zellen [Promega Corporation, 2009] oder aber im Falle des Neutralrot-Tests die Anreicherung eines Farbstoffs mit entsprechenden physikochemischen Eigenschaften in lebenden Zellen [Freshney, 2005].

### **2.5.4.2 Apoptoseassays**

Neben den bereits unter 2.5.2 genannten mikroskopisch erkennbaren morphologischen Veränderungen können apoptotische Vorgänge auch durch verschiedene andere Techniken nachgewiesen werden.

Der Nachweis von Apoptose in einer Zellkultur kann über den Nachweis der aktivierten Caspasen erfolgen. Dabei wird häufig auf das Vorhandensein von Caspase 3 geprüft, da diese die wichtigste Effektorcaspase darstellt. Da es sich bei den Caspasen um Proteine handelt, können sie über eine antikörpervermittelte Reaktion mittels Immunhistochemie oder Western Blot detektiert werden [Thuret et al., 2008]. Um darüber hinaus die Aktivität von Caspasen zu bestimmen, eignet sich der Einsatz von pro-luminogenen oder pro-fluorogenen Substraten, die durch die Abspaltung einer Peptidsequenz, die spezifisch durch die jeweilige

Caspase vermittelt wird, in ein lumineszierendes bzw. fluoreszierendes Produkt umgesetzt werden. Die Intensität des erhaltenen Signals erlaubt eine Aussage über die Caspaseaktivität. So können beispielsweise für den Nachweis von Caspase 3 Z-DEVD-Rhodamin 110 oder Acetyl-DEVD-7-amino-4-methylcoumarin als profluorogene Substrate eingesetzt werden, wobei DEVD für die Peptidsequenz Asparaginsäure-Glutaminsäure-Valin-Asparaginsäure steht (Z bezeichnet die Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe) [Härtel et al., 2003; Gaunitz und Heise, 2003; Thuret et al., 2008]. In der hier vorliegenden Arbeit wurden lumineszenzbasierte Assays zum Nachweis von Caspasen eingesetzt. Das Prinzip dieser Assays wird anhand des Caspase-Glo 3/7-Assay erläutert (Abbildung 2.6): In Zellen, die sich in Apoptose befinden, wird die Procaspase 3 zu der aktiven Caspase 3 aktiviert. Durch das Assayreagenz wird die Zellmembran lysiert und die aktivierte Caspase freigesetzt, damit sie das proluuminogene Assaysubstrat umsetzen kann. Bei dieser Reaktion entsteht durch Abspaltung der für das Enzym spezifischen Peptidsequenz Asparaginsäure-Glutaminsäure-Valin-Asparaginsäure das Aminoluciferin. Dieses ist wiederum das Substrat für die im Assay enthaltene Luciferase. Bei dieser Umsetzungsreaktion, die in Gegenwart von Magnesium und unter Beteiligung von ATP und Sauerstoff stattfindet, entsteht Oxiluciferin, und Lichtquanten werden emittiert. Das erhaltene Lumineszenzsignal ist dabei proportional zur Caspaseaktivität.

Um zwischen den Initiationswegen der Apoptose zu differenzieren, kann analog der Nachweis der aktivierten Caspasen 8 und 9 erfolgen [Hickey et al., 2005]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Nachweis ebenfalls über lumineszenzbasierte Assays durchgeführt, in denen das jeweilige proluuminogene Substrat eine andere, für die entsprechende Caspase spezifische Peptidsequenz trägt [Promega Corporation, 2007a, 2008b]. Ansonsten verläuft die Detektionsreaktion analog des in Abbildung 2.6 dargestellten Schemas des Caspase-Glo 3/7 Assays.

Apoptotische Zellen können auch anhand der Veränderung ihrer Membranstruktur detektiert werden. Das Protein Annexin V ist in der Lage, Phosphatidylserin zu binden, das bereits zu einem frühen Zeitpunkt während des Apoptoseprozesses von der intrazellulären Seite auf

Des Weiteren können die Fragmente, die infolge der Spaltung der DNA-Stränge durch spezifische Endonukleasen entstehen, mittels Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Da die Größe der DNA-Fragmente Vielfachen von 180-200 Basenpaaren entspricht, ergibt sich im elektrophoretischen Bild eine typische Leiterstruktur [Hug, 2000]. Bei nekrotischen Zellen hingegen verläuft der DNA-Abbau unspezifisch, sodass Bruchstücke diverser Längen entstehen, die bei der Elektrophorese keine speziellen Banden, sondern ein Schmierbild ergeben [Stephan et al., 2000].

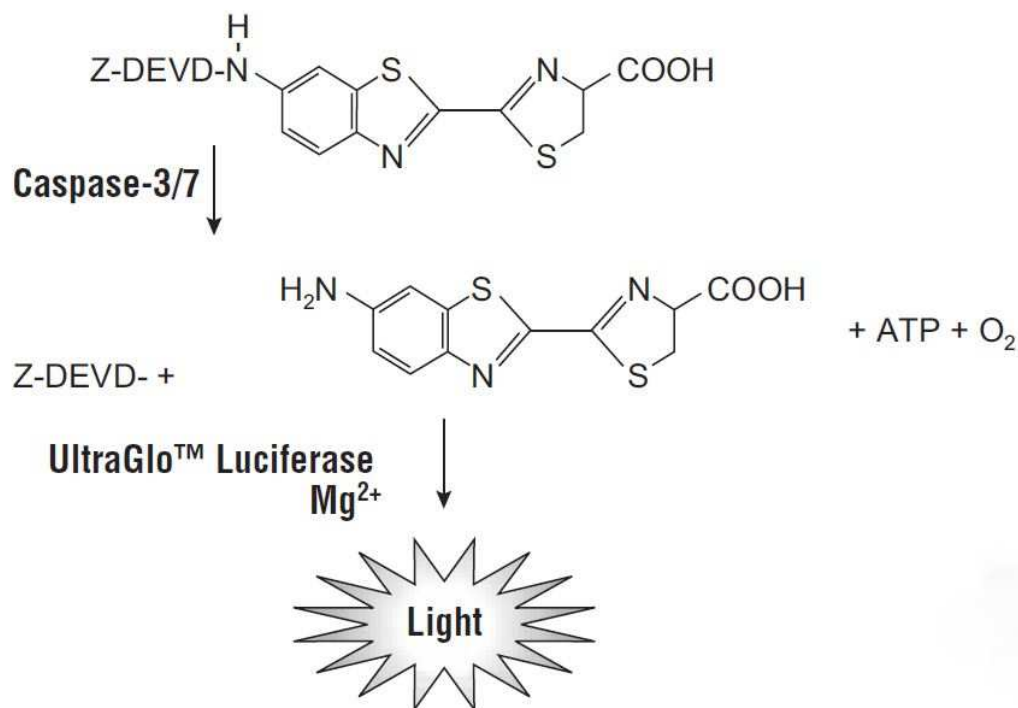


Abbildung 2.6: Umsetzungsreaktion des Caspase-Glo 3/7 Assays zum Nachweis aktivierter Caspasen 3 und 7 (Promega Corporation, 2005).

Bei der TUNEL-Technik (abgekürzt von: terminal desoxynucleotidyl-transferase mediated dUTP nick end labeling) können die Zellkerne apoptotischer Zellen visualisiert werden. Als Target dienen hierbei die 3'OH-Enden der DNA-Fragmente, die bei der Apoptose in großer Zahl entstehenden. Die Anzahl von DNA-Strangbrüchen liegt bei nekrotischen Zellen etwa eine Zehnerpotenz niedriger [Darzynkiewicz et al., 1997]. Die 3'OH-Enden der DNA-Fragmente werden mittels terminaler Transferase mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden verknüpft. Dadurch können die apoptotischen Zellen wiederum fluoreszenzmikroskopisch oder durchflusscytometrisch detektiert werden [Stephan et al., 2000; Darzynkiewicz et al., 1997].

Bei dem Nachweis von Apoptose in Zellkulturen ist zu beachten, dass aufgrund der Abwesenheit von Phagozyten die Apoptosekörper nicht eliminiert werden können, sodass unter den Bedingungen in vitro schließlich auch diese ihre Membranfunktionalität einbüßen. Dieser Prozess wird als sekundäre Nekrose bezeichnet und bedingt, dass eine Unterscheidung von spätapoptotischen Zellen von nekrotischen Zellen erschwert ist [Darzynkiewicz et al., 1997]. Des Weiteren sei darauf hingewiesen, dass Zellen nicht immer alle apoptosetypischen Merkmale zeigen, sodass es sinnvoll ist, mindestens zwei Nachweismethoden zu kombinieren, die verschiedene Targets ansteuern [Darzynkiewicz et al., 1997]. Außerdem ist es ratsam, stets eine Positivkontrolle für eine Apoptoseinduktion mitzuführen. Dafür können beispielsweise Staurosporin, Taxol oder Ricin eingesetzt werden [Bertrand et al., 1994; Collins et al., 1997].

#### **2.5.4.3 Zytotoxizitätsassays**

Zytotoxizitätsassays nutzen den Verlust der Membranintegrität, der bei nekrotischen Zellen bereits zu einem frühen Zeitpunkt des Prozesses stattfindet. Da unter In-vitro-Bedingungen keine Phagozytose von Apoptosekörpern erfolgt und deren Membranintegrität nicht dauerhaft aufrechterhalten werden kann, werden auch spätapoptotische Zellen von Zytotoxizitätsassays erfasst [Darzynkiewicz et al., 1997]. Zelluläre Assays zum Nachweis

von Nekrose oder sekundärnekrotischen Prozessen nutzen entweder, dass Detektionsreagenzien aufgrund der geschädigten Membranstruktur in der Lage sind, sich im Zellinneren anzureichern, oder aber die Freisetzung von Enzymen, die im physiologischen Zustand nur intrazellulär vorhanden sind, wie z.B. der Laktatdehydrogenase (LDH) oder anderer Proteasen [Decker und Lohmann-Matthes, 1988; Promega Corporation, 2007b, 2013].

Der in dieser Arbeit eingesetzte Zytotoxizitätsassay CytoTox-Glo beruht auf der durch Membranruptur ermöglichten Freisetzung einer bestimmten Protease aus dem Zellinneren. Da das Assaysubstrat nicht in der Lage ist, intakte Membranen zu durchdringen, kann die Reaktion zwischen der Protease und dem Substrat nur bei Zellen mit Membranschädigung erfolgen. Bei dem Substrat handelt es sich um das mit der Peptidsequenz Alanin-Alanin-Phenylalanin (AAF) verknüpfte Aminoluciferin. Bei der Umsetzung durch die sogenannte „Dead-cell protease“ wird diese Peptidsequenz abgespalten und das dabei freigesetzte Aminoluciferin ist der Luciferin-Luciferase-Reaktion zugänglich, da der Assay die dafür notwendigen Komponenten beisteuert (Abbildung 2.7). Das gemessene Lumineszenzsignal ist proportional zur Menge toter Zellen. In einem zweiten Schritt ermöglicht der Assay durch Zugabe eines Lyseresagenzes die in der Kultur vorhandenen, bis zu diesem Zeitpunkt lebenden Zellen aufzuschließen, sodass die Gesamtzellzahl der Kultur in einer zweiten Lumineszenzmessung bestimmt werden kann. Aus beiden Messungen kann der prozentuale Anteil toter Zellen in der Kultur kalkuliert werden [Promega Corporation, 2013].

Der Nachweis einer LDH-Freisetzung kann über eine gekoppelte enzymatische Reaktion erfolgen, in der zunächst Lactat unter Beteiligung von NAD zu Pyruvat umgesetzt wird und das resultierende NADH die enzymatische Umsetzung von Resazurin zu Resorufin durch das Enzym Diaphorase ermöglicht [Gaunitz und Heise, 2003; Promega Corporation, 2007b]. Das Ausmaß der Resorufinbildung kann UV-spektrometrisch oder fluorimetrisch erfasst werden und gibt Auskunft über die Menge der in der Kultur vorhandenen toten Zellen. Der Nachweis von freigesetzter LDH aus membrangeschädigten Zellen liefert vergleichbare Ergebnisse zu der zuvor klassischerweise eingesetzten <sup>51</sup>Chrom-Freisetzung, die eine

vorherige Beladung der Zellkultur mit dem radioaktiven Material und intensives Waschen erfordert. Daher bietet ein LDH-basierter Assay den Vorteil, dass das aufwendige Arbeiten mit radioaktivem Material, hinsichtlich der Vermeidung von Kontakt, der Lagerung und der Entsorgung, unterbleibt. Darüber hinaus ist das Ergebnis eines LDH-basierten Assays wesentlich schneller verfügbar [Decker und Lohmann-Matthes, 1988].

Eine intakte Zellmembran verhindert das Eindringen von kationisch geladenen Fluoreszenzfarbstoffen wie Trypanblau, Propidium- oder Ethidiumiodid, sodass eine kurze Inkubationszeit eine selektive Färbung nekrotischer oder spätapoptotischer Zellen erlaubt, während lebende Zellen lediglich eine minimale Fluoreszenz zeigen. Da während eines Apoptoseprozesses die Transportfunktion der Membran, bevor sie ganz zum Erliegen kommt, bereits eingeschränkt ist, kann die Aufnahme für kationisch geladene Fluoreszenzfarbstoffe erhöht sein, sodass sich in Apoptose befindliche Zellen eine moderate Fluoreszenz aufweisen können [Darzynkiewicz et al., 1997]. Zur erleichterten Unterscheidung der Zellpopulationen ist es daher vorteilhaft eine kombinierte Apoptose-Nekrose-Fluoreszenzfärbung durchzuführen, wie sie in 2.5.4.4 beispielhaft erläutert wird. Auch eine Positivkontrolle für nekrotische Zellen sollte bei einem Zytotoxizitätsassay mitgeführt werden. Die Membranschädigung kann beispielsweise mit Tensiden wie Natriumdodecylsulfat (SDS), Triton X-100 oder Digitonin herbeigeführt werden [Sakai et al., 1998; Promega Corporation, 2007b, 2013].

Zytotoxische Effekte können auch indirekt über eine Abnahme der Zellviabilität abgebildet werden. Dabei ist es erforderlich die Viabilität einer ungeschädigten Zellpopulation mitzuführen, die die Ausgangssituation der Stoffwechselleistung darstellt. Andersherum ist es aber nicht möglich, einen Zytotoxizitätsassay für eine Bestimmung der Zellviabilität einzusetzen.

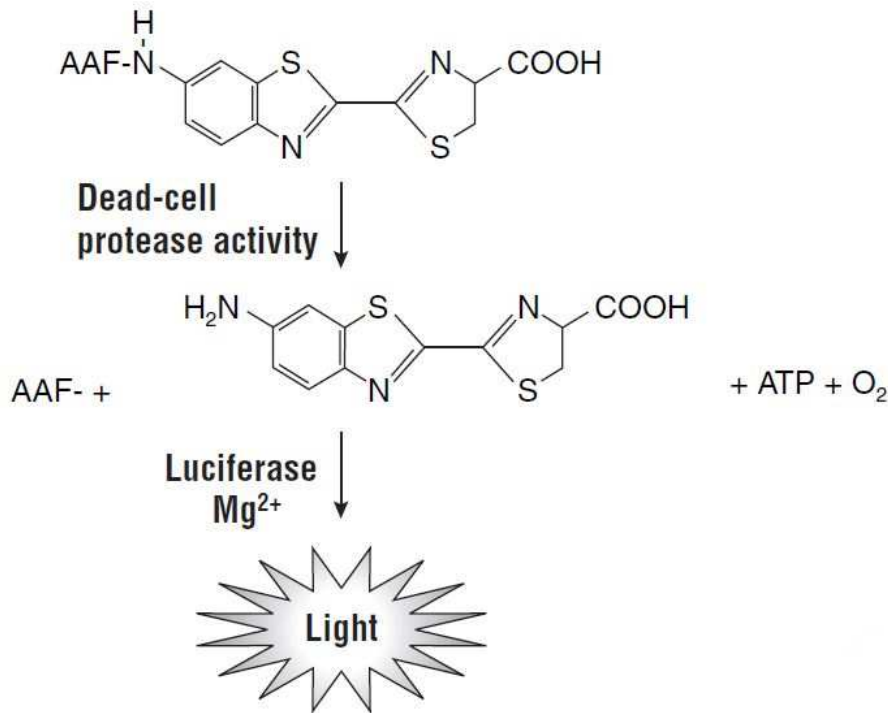


Abbildung 2.7: Umsetzungsreaktion des CytoTox-Glo Assays zum Nachweis von Zellen mit beeinträchtigter Membranintegrität (Promega Corporation, 2013).

#### 2.5.4.4 Apoptose-Nekrose-Fluoreszenzfärbung

Zur Visualisierung der apoptotischen und nekrotischen Schädigungsanteile kann eine Apoptose-Nekrose-Fluoreszenzfärbung durchgeführt werden. Nekrotische Zellen werden dabei durch einen Fluoreszenzfarbstoff markiert, der an die zelluläre DNA bindet, aber nicht in der Lage ist, intakte Membranen zu passieren. Bei dem in dieser Arbeit eingesetzten Apoptose-Nekrose-Detektionskit sorgt das Ethidium Homodimer III, das als ein stark positiv geladenes Molekül nicht in der Lage ist, die Zellmembran gesunder oder frühapoptotischer Zellen zu durchdringen, für eine Färbung nekrotischer Zellen, da deren Membranintegrität nicht mehr vorhanden ist (Abbildung 2.8). Durch die Bindung des Farbstoffs an die DNA entsteht eine intensiv rote Fluoreszenz. Die Färbung apoptotischer Zellen kann durch Annexin V erfolgen, wenn dieses mit einem Fluoreszenzfarbstoff, wie z.B. FITC, gekoppelt ist. Auch Annexin V vermag nicht, eine intakte Zellmembran zu durchdringen. Das Molekül



weist allerdings eine hohe Bindungsaffinität zu Phosphatidylserin auf, das in apoptotischen Zellen von der inneren auf die äußere Membranseite transloziert wird. Dadurch emittieren apoptotische Zellen eine grüne Fluoreszenz. Zu beachten ist dabei, dass in nekrotischen Zellen aufgrund der Lyse der Zellmembran das Annexin V-FITC-Konjugat Phosphatidylserin auf der inneren Membranseite binden kann [Fiers et al., 1999]. Deshalb zeigen nekrotische Zellen in jedem Fall eine rote Fluoreszenz, können aber auch zusätzlich eine grüne Fluoreszenz aufweisen. Apoptotische Zellen zeigen eine grüne Fluoreszenz. Wenn der Apoptoseprozess allerdings weit fortgeschritten ist, tritt unter den Bedingungen in vitro zusätzlich die rote Fluoreszenzfärbung durch den DNA-bindenden Farbstoff auf. Das liegt darin begründet, dass die spätapoptotischen Zellen schließlich doch ihre Membranintegrität verlieren, da in Kultur keine zur Phagozytose befähigten Zellen vorhanden sind. Die Differenzierung von spätapoptotischen Zellen und nekrotischen Zellen ist durch eine solche Fluoreszenzfärbung daher nicht möglich. Deshalb ist es wichtig, einen möglichen apoptotischen Prozess in einem frühen Stadium zu detektieren. Da in vitalen Zellen keine Bindung der beiden Detektionsreagenzien erfolgt, zeigen diese keine Fluoreszenz.

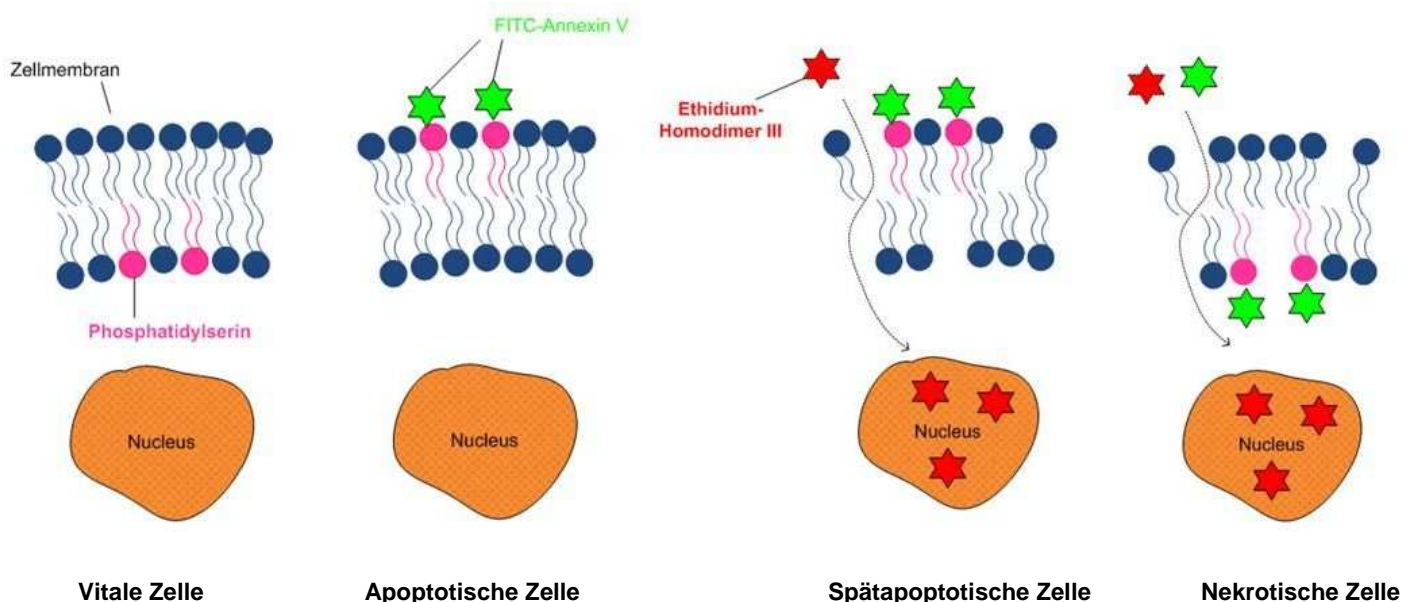


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung der Apoptose-Nekrose-Fluoreszenzfärbung.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Material**

#### **3.1.1 Biologisches Material**

Zur Gewinnung von Primärkulturen humaner cornealer stromaler Zellen wurden sclerale Ringe mit Resten von cornealem Gewebe von der Augenklinik der Medizinischen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt, die bei Transplantationsoperationen von humanen Spenderhornhäuten zurückbleiben. Die Zellkulturarbeiten zur Isolation und Kultivierung der cornealen Stromazellen sowie deren Langzeitkultivierung für die Untersuchung der zellulären Expression extrazellulärer Matrix wurden durch positive Voten der Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover unterstützt.

### **3.2 Allgemeine Methoden der Zellkultivierung**

#### **3.2.1 Zellkulturen**

Alle Arbeitsschritte der Isolierung und Kultivierung der Zellen wurden unter einer Laminar-Air-Flow Werkbank (Heraeus, D-Hanau) durchgeführt. Die dafür benutzten Geräte wurden zuvor hitzesterilisiert bzw. autoklaviert. Verwendete Einmalartikel aus Kunststoff wurden steril bezogen. Medien, Medienbestandteile, Supplemente, Pufferlösungen etc. wurden ebenfalls steril bezogen bzw. vor Verwendung sterilisiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C in einem Inkubator (Heraeus) in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5%.

### **3.2.2 Corneale Zellkulturen**

#### **3.2.2.1 Immortalisierte humane corneale Epithelzellen - HCE-T**

Bei den eingesetzten humanen cornealen Epithelzellen handelt es sich um eine immortalisierte Zelllinie, die von Araki-Sasaki et al. ausgehend von den Zellen einer 49-jährigen Spenderin durch Transfektion mit einem rekombinanten SV40-Vektor hergestellt und eingehend charakterisiert wurde [Araki-Sasaki et al., 1995]. Die Zelllinie wurde von der RIKEN Cell Bank erworben (J-Tsukuba) und in dem für diese Zelllinie standardmäßig verwendeten Wachstumsmedium kultiviert, das sich aus einem 1:1 Gemisch von Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Biochrom, D-Berlin) und Ham's F12 (Biochrom), 5% fetalem Rinderserum (FBS, Biochrom), 10 ng/ml epidermalem Wachstumsfaktor (EGF, Biochrom), 5 µg/ml Insulin (Biochrom), 0,1 µg/ml Choleratoxin (Sigma, D-Deisenhofen) und 0,5% DMSO (Sigma) sowie 1% Antibiotika/Antimykotika-Lösung (PAA, A-Linz) zusammensetzte. Durch die Zugabe der Antibiotika/Antimykotika-Lösung ergaben sich im Medium Konzentrationen von 100 IE/ml Penicillin G, 0,1 mg/ml Streptomycinsulfat und 0,25 µg/ml Amphotericin B.

Für den Aufbau des Cornea-Konstruktes wurden Zellen der Passagen 116-159 verwendet. Zuvor wurden die HCE-T-Zellen auf ein Medium ohne Choleratoxin (im Folgenden als Sasaki-Medium bezeichnet) umgestellt, da Choleratoxin zwar einen mitogenen Effekt auf epitheliale Zellen aufweist, aber das Wachstum von Fibroblasten hemmt [Freshney, 2005; Taylor-Papadimitriou et al., 1980; Hollenberg und Cuatrecasas, 1973].

#### **3.2.2.2 Immortalisierte humane corneale Keratozyten - HCK**

Bei den eingesetzten humanen cornealen Keratozyten handelt es sich um eine immortalisierte Zelllinie, die durch Transfektion mit einem SV40-Vektor aus einer Primärkultur humaner cornealer Keratozyten hervorgegangen ist [Zorn-Kruppa et al., 2005]. Die HCK-Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. Zorn-Kruppa zur Verfügung gestellt.

Die Kultivierung der HCK-Zellen erfolgte in Medium F99, das eine 1:1 Mischung der beiden Basalmedien Ham's F12 und Medium 199 (Biochrom, D-Berlin) darstellt, mit dem Zusatz von 5% FBS und 1% Antibiotika/Antimykotika-Lösung. Die Zellen wurden sowohl in der unter 3.3.1 beschriebenen Studie zur Verfestigung der Biomatrix eines Cornea-Konstruktes für In-vitro-Arzneistoffabsorptionsuntersuchungen als auch in der unter 3.3.2 beschriebenen Studie zur Stimulation der Synthese extrazellulärer Matrix in stromalen Zellen eingesetzt. Dabei wurden die Passagen 33-86 verwendet.

Für den Aufbau des Cornea-Konstruktes erfolgte im Vorfeld eine Angleichung des Mediums an das für die HCE-T-Zellen verwendete Sasaki-Medium. Zu diesem Zweck wurde einerseits versucht, die HCK-Zellen sukzessive an Sasaki-Medium zu adaptieren, indem der Medienwechsel über eine wöchentliche Erhöhung des Anteils an Sasaki-Medium (1:1, 2:1, 4:1, 10:1) erfolgte. Zum anderen wurde auf die gleiche Weise das Basalmedium F99 schrittweise mit EGF und Insulin supplementiert bis zu einer Konzentration von 10 ng/ml bzw. 5 µg/ml.

### **3.2.2.3 Immortalisierte humane corneale Endothelzellen - HENC**

Bei den verwendeten humanen cornealen Endothelzellen handelt es sich ebenfalls um eine immortalisierte Zelllinie. Ausgehend von einer Primärkultur humaner cornealer Endothelzellen, die nach einer von Engelmann et al. [1988] beschriebenen Methode aus der Hornhaut eines 91-jährigen Spenders gewonnen wurde, erfolgte die Immortalisierung durch SV40-Transfektion mittels Elektroporation [Bednarz et al., 2000]. Die HENC-Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. Bednarz zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung der Zelllinie erfolgte ebenfalls in Medium F99 mit Zusatz von 5% FBS und 1% Antibiotika/Antimykotika-Lösung.

Für den Aufbau des Cornea-Konstruktes wurden Zellen der Passagen 28-71 verwendet. Zuvor erfolgte auch hier, wie für die HCK-Zellen beschrieben, eine schrittweise Angleichung des Mediums an das für die Kultivierung der HCE-T-Zellen verwendete Sasaki-Medium.

#### **3.2.2.4 Primäre humane Fibroblasten - HuFib**

In der unter 3.3.2 beschriebenen Studie zur Stimulation der Synthese extrazellulärer Matrix in stromalen Zellen wurden neben den immortalisierten HCK-Zellen auch primäre humane corneale Fibroblasten eingesetzt. Für die Isolierung von primären humanen Fibroblasten (HuFib) wurden zunächst das Epithel und das Endothel von den corneoscleralen Ringen mit Hilfe eines Skalpells entfernt. Von dem inneren, transparenten, cornealen Teil der corneoscleralen Ringe wurden etwa 2 x 2 mm große Stücke geschnitten, die zum Anheften in eine 6-Well-Zellkulturplatte (TPP, CH-Trasadingen) gegeben und anschließend mit Medium überschichtet wurden. Nach 6-7 Tagen war ein Auswachsen der stromalen Zellen aus den Gewebestücken erkennbar. Die aus insgesamt vier corneoscleralen Ringen gewonnenen Zellen wurden zusammengeführt und bis zur Verwendung kryokonserviert. Für die im Folgenden unter 3.3.2 beschriebenen Untersuchungen wurden Zellen der Passagen 5-15 verwendet.

Die humanen cornealen stromalen Zellen wurden in dem Wachstumsmedium DMEM kultiviert, das 10% FBS, 4 mM L-Glutamin (L-Glutaminlösung 200mM von Gibco, D-München) sowie 1% Antibiotika/Antimykotika-Lösung enthielt. Durch das serumhaltige Kultivierungsmedium exprimierten die Zellen den Fibroblasten-Phänotyp.

#### **3.2.3 Humane dermale Fibroblasten - HDF**

Für die im Folgenden unter 3.3.2 beschriebene Studie zur Stimulation der Synthese extrazellulärer Matrix in stromalen Zellen wurden neben den cornealen stromalen Zellen außerdem humane dermale Fibroblasten (HDF) für vergleichende Untersuchungen herangezogen. Die aus Neugeborenenenvorhäuten isolierten Primärzellen wurden von der Firma Cascade (UK-Mansfield) bezogen. Die Kultivierung der HDF-Zellen erfolgte ebenfalls in dem Wachstumsmedium DMEM mit 10% FBS, 4 mM L-Glutamin sowie 1% Antibiotika/Antimykotika-Lösung. Für die Untersuchungen wurden Zellen der Passagen 4-5 verwendet.

### **3.2.4 Kultivierung und Subkultivierung**

Die Stammkulturen wurden in Kulturgefäßen aus Polystyrol (Sarstedt, D-Nümbrecht) mit einer Wachstumsfläche von 25 oder 75 cm<sup>2</sup> kultiviert. Der Austausch des Mediums erfolgte dreimal wöchentlich. Zur Subkultivierung wurden die Zellen kurz vor Erreichen der vollständigen Konfluenz mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, Biochrom, D-Berlin) gewaschen und durch eine 4-10 minütige Inkubation mit einer Trypsin (0,05%)-EDTA (0,02%)-Lösung (PAA, A-Linz) von der Kultivierungsoberfläche abgelöst. Im Falle der HCE-T-Zellen erfolgte nach dem Waschschrift mit PBS zunächst eine zweiminütige Inkubation mit einer 2%igen EDTA-Lösung (MP Biomedicals, USA-Solon). Der Trypsinisierungsprozess wurde durch Zugabe des serumhaltigen Mediums gestoppt und mögliche Zellcluster wurden durch intensives Auf- und Abpipettieren der Zellsuspension dispergiert. Zur Ermittlung der Zelldichte wurde die Zellsuspension nach 20-facher Verdünnung mit einem Coulter Counter Z2 (Beckman Coulter, D-Krefeld) ausgezählt. Anschließend wurden die Zellen wieder in Kulturflaschen mit dem entsprechenden Wachstumsmedium in einer Zelldichte von etwa 4.000/cm<sup>2</sup> eingesät.

### **3.2.5 Kryokonservierung**

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen in Wachstumsmedium suspendiert, das 10% DMSO als Kryoprotektivum enthielt. Aliquote von 1 ml, die je 1.000.000 Zellen enthielten, wurden zunächst für 2 Stunden in die Gasphase über flüssigem Stickstoff gebracht, anschließend in die flüssige Stickstoffphase abgesenkt und dort gelagert.

Bei Bedarf wurden Aliquote der Zellsuspension zügig aufgetaut und in bereits auf 37°C temperiertem Medium vereinzelt. Nach Anheftung der Zellen wurde das Medium vollständig ausgetauscht, um Reste des toxischen DMSO zu entfernen.

### **3.2.6 Prüfung auf Mykoplasmenfreiheit**

Zur Erkennung einer möglichen Infektion der Stammkulturen mit Mykoplasmen wurden diese mindestens alle 3 Monate untersucht. Zunächst wurde für die Untersuchung der MycoAlert Assay (Lonza, USA-Rockland) verwendet, der das Vorhandensein von Mykoplasmen in der Kultur über eine Luciferin-Luciferase-Reaktion und ein entsprechend resultierendes Lumineszenzsignal erfasst. Wegen des teilweise ungünstigen Signal-Rausch-Verhältnisses des Assays wurde die Untersuchung alsbald auf das PCR-basierte MycoTrace Mykoplasmen Detektionskit (PAA, A-Linz) umgestellt.

Im Fall von positiv getesteten Kulturen wurden diese entweder verworfen und durch kryokonservierte Kulturen ersetzt oder die Kulturen wurden einer antimykoplasmalen Behandlung mit Mycoplasma Removal Agent (MP Biomedicals, USA-Solon) unterzogen. Eine erneute Testung erfolgte nach spätestens 4 Wochen, um den Erfolg der Behandlung zu bestätigen.

### **3.2.7 Mikroskopie**

Die Zellkulturen wurden routinemäßig lichtmikroskopisch hinsichtlich ihrer Morphologie und ihres Wachstums untersucht. Für die Betrachtung und graphische Dokumentation wurden ein inverses Phasenkontrastmikroskop Olympus IX 50 (Olympus, D-Hamburg), das mit einer Olympus XC 30 Kamera ausgestattet war, und die zugehörige Bildbearbeitungssoftware cell<sup>F</sup> verwendet.

### **3.2.8 Bradford-Bestimmung**

Zur Ermittlung des Gesamtproteingehalts in Proben wurde die Proteinbestimmung nach Bradford herangezogen [Bradford, 1976]. Sie beruht darauf, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 (SERVA, D-Heidelberg) durch die Bindung an Aminosäuren sein Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm verschiebt. Der Protein-Farbstoff-Komplex bildet sich innerhalb weniger Minuten und bleibt ca. 1 h löslich [Bradford, 1976].

Für die Herstellung des Farbstoffreagenzes wurden 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 in 50 ml Ethanol 95% (V/V) (Ethanol 100% (V/V) von Roth, D-Karlsruhe) gelöst. Nach Zugabe von 100 ml 85%iger (m/V) Phosphorsäure (Silbermann, D-Gablingen) wurde mit destilliertem Wasser zu 1000 ml ergänzt. Das Reagenz wurde unmittelbar vor der Verwendung filtriert. Zur Kalibrierung wurde eine Verdünnungsreihe von Rinderserumalbumin (BSA, Sigma, D-Deisenhofen) in Phosphatpuffer pH 7,6 hergestellt (0, 10, 50 und 100 µg/ml).

Zur Bestimmung des Proteingehalts der Proben wurden in einer 24-Well-Zellkulturplatte (TPP, CH-Trasadingen) 100 µl Probe bzw. Kalibrierlösung mit 1000 µl Farbstoffreagenz versetzt, gut gemischt und für 2 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Extinktion bei 595 nm mit einem Multiplatten-Photometer PowerWave XS (Bio-Tek Instruments, D-Bad Friedrichshall). Falls erforderlich wurden die Proben mit Phosphatpuffer verdünnt, sodass die Extinktion innerhalb des kalibrierten Bereiches lag.

### **3.3 Studienbezogene Methoden**

#### **3.3.1 Studienaufbau zur Verfestigung der Biomatrix eines Cornea-Konstruktes für In-vitro-Arzneistoffabsorptionsuntersuchungen**

Diese Studie beschäftigte sich mit Modifikationen des Aufbaus eines von Reichl etablierten humanen Cornea-Konstruktes für In-vitro-Arzneistoffabsorptionsuntersuchungen [Reichl, 2003; Reichl et al., 2004]. Die im Folgenden dargestellten Variationen betreffen die Stromabiomatrix und verfolgten zum einen das Ziel das Cornea-Konstrukt ausschließlich unter Verwendung von immortalisierten Zelllinien aufzubauen und zum anderen die mechanische Festigkeit des Konstruktes, die für die Handhabung bei den In-vitro-Arzneistoffabsorptionsuntersuchungen von Bedeutung ist, zu verbessern.



### **3.3.1.1 Kultivierung und Charakterisierung des organotypischen Cornea-Konstruktes**

Für den Aufbau der organotypischen humanen Cornea-Konstrukte (HCC) wurde die von Reichl etablierte Methode modifiziert [Reichl, 2003; Reichl et al., 2004]. Um die Standardisierbarkeit des Herstellungsprozesses zu optimieren, wurde für die Bildung des Stromabioäquivalentes anstelle der nativen humanen Fibroblasten die immortalisierte humane corneale Keratozytenzelllinie HCK verwendet, sodass für den Aufbau des gesamten HCC ausschließlich immortalisierte Zelllinien eingesetzt wurden. Hierfür war es zunächst erforderlich, die notwendige Menge an HCK-Zellen zu ermitteln, die für eine vergleichbare Kontraktion der Collagenmatrix sorgt, wie sie zuvor für die Verwendung nativer humaner Fibroblasten beschrieben wurde [Döhring, 2009]. Des Weiteren wurde anstelle der CEPI-Zelllinie die ebenfalls immortalisierte humane epitheliale HCE-T-Zelllinie eingesetzt, die sich von der CEPI-Zelllinie durch die Ausbildung einer dichteren epithelialen Barriere unterscheidet und deren Eignung für den Aufbau des HCC bereits gezeigt werden konnte [Reichl, 2008; Döhring, 2009].

Eine weitere Modifikation des klassischen Herstellungsprotokolls wurde durch die Variation der Reihenfolge des Aufbaus der Zellschichten vorgenommen. Außerdem wurde das modifizierte Herstellungsprotokoll an den Aufbau der HCC in 12er-Transwell-Platten angepasst, wodurch miniaturisierte Cornea-Konstrukte (mHCC) eines geringeren Durchmessers erhalten wurden. Diese boten den Vorteil, dass beim Einsatz gleicher Mengen Ausgangsmaterial eine höhere Probenzahl generiert werden konnte. Einen Überblick über die Herstellungsvarianten des HCC gibt Tabelle 3.1.

Ausgehend von diesen mHCC wurden eingehende Untersuchungen zur Anwendbarkeit eines Collagen-Crosslinkings mittels Riboflavin und UVA-Strahlung zur Verfestigung der Biomatrix an isolierten Stromabioäquivalenten durchgeführt, die unter 3.3.1.2 detailliert beschrieben werden.

Tabelle 3.1: Überblick über die Varianten des Aufbaus des organotypischen Cornea-Konstruktes.

	<b>HCC</b>	<b>HCC</b>	<b>mHCC</b>
	<b>klassischer Aufbau</b>	<b>variierter Aufbau</b>	<b>variierter Aufbau</b>
<b>Kultivierung</b>			
<b>im Transwell</b>	6 Insert / Platte	6 Insert / Platte	12 Insert / Platte
<b>Bodengel</b>	1 ml	-	-
<b>Endothelzellen</b>	300.000	300.000	100.000
<b>Stromazellen</b>	250.000 / 3 ml	250.000 / 3 ml	83.000 / 1 ml
<b>Epithelzellen</b>	150.000	150.000	50.000
<b>Dauer der Kultivierung</b>	28 Tage	24 Tage	24 Tage

#### 3.3.1.1.1 Präparation von Collagen aus Rattenschwanzsehnen

Das für die Herstellung der Cornea-Konstrukte verwendete Collagen wurde aus Rattenschwanzsehnen gewonnen. Dafür wurden etwa 10 tiefgefrorene Rattenschwänze nach einminütigem Einlegen in Ethanol 70% (V/V) mittels Pinzette und Skalpell von ihrer Außenhaut befreit. Die Sehnen, die um die Schwanzknochen angeordnet sind, konnten dann durch Abknicken der Knochensegmente der Schwanzspitze leicht herausgezogen werden [Freshney, 1990]. Zur Extraktion des Collagens wurden die entnommenen Sehnen mit dem Skalpell von den Knochensegmenten befreit und zerkleinert und sodann in 1000 ml Essigsäure 3% (Essigsäure 100% (Eisessig) von Roth, D-Karlsruhe) über drei Tage unter Rühren dispergiert. Ungelöste Bestandteile wurden anschließend mittels Filtration durch Mull abgetrennt. Zur Abtrennung niedermolekularer Proteine wurde die Lösung für zwei Tage

gegen 4000 ml Essigsäure 0,5% unter Verwendung der Dialysemembran Spectropore MWCO 6000-8000 (Spectrum Medical Industries, USA-Los Angeles) dialysiert. Das Dialysat wurde in Aliquoten lyophilisiert und später zum Gebrauch in Essigsäure 0,05% zur gewünschten Konzentration gelöst.

Das so gewonnene Collagen enthielt überwiegend Collagen Typ I wie in vorangegangenen Untersuchungen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese gezeigt werden konnte [Boozchaloo und Reichl, 1996; Ghiani und Grobe, 2005].

#### **3.3.1.1.2 Aufbau des organotypischen Cornea-Konstruktes**

Der Aufbau der humanen Cornea-Konstrukte erfolgte schrittweise in Transwell-Einsätzen (Costar-Corning, D-Fernwald), die einen Durchmesser von 24 mm und eine Polycarbonatmembran mit einem Porendurchmesser von 3 µm aufwiesen. Für die klassische Herstellung der HCC in einer 6er-Transwell-Platte wurde zunächst ein zellfreies Collagengel durch Mischen von 6 ml Collagenlösung (1,6 mg/ml) mit 1,8 ml Gelvormischung, bestehend aus 22 Volumenteilen zehnfach konzentriertem Minimal Essential Medium (Biochrom, D-Berlin), 2 Volumenteilen L-Glutaminlösung, 25 Volumenteilen FBS und 7 Volumenteilen Natriumhydrogencarbonatlösung (71,2 mg/ml, Sigma, D-Deisenhofen), hergestellt. Durch den Zusatz der Gelvormischung wurde die essigsäure Collagenlösung neutralisiert, wodurch die Gelierung einsetzte. Je 1 ml dieses Bodengels wurde zügig auf die Membran eines Inserts pipettiert. Nach dem Erstarren wurde das Gel kurz mit F99 gespült und 300.000 Endothelzellen in 1 ml F99 wurde aufgebracht. Um das Anheften der Zellen auf dem Substrat zu gewährleisten, wurde zunächst für 2 Stunden bei 37°C inkubiert, bevor je 4 ml F99 pro Well (1 ml in das Insert, 3 ml in das untere Kompartiment) ergänzt wurden. Das Endothel wurde für 7 Tage submers bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert.

Für die Herstellung des Stromabioäquivalentes wurden HCK-Zellen in 1,68 ml F99 vereinzelt und mit 4,66 ml Gelvormischung versetzt. Diese Mischung wurde gleichmäßig in 15,4 ml Collagenlösung (1,6 mg/ml) verteilt und je 3 ml dieser gelierenden Zellsuspension wurden zügig in die Inserts pipettiert. Nach dem vollständigen Erstarren der Gele wurde das

Kultivierungsmedium ergänzt. Nach weiteren 2 Stunden wurden die Endothel-Stromabioäquivalente mit Hilfe eines Spatels vorsichtig von der Wand der Transwell-Inserts gelöst, um in den nächsten Tagen eine gleichmäßige Kontraktion der Gelmatrix durch die Aktivität der stromalen Zellen zu ermöglichen. Es war an dieser Stelle zunächst erforderlich, die Einsaatdichte der HCK-Zellen zu ermitteln, die eine Gelkontraktion verursachte, die derjenigen entsprach, die bei den zuvor verwendeten primären humanen Fibroblasten auftrat. Dafür wurde im stromalen Teil die Zellzahl der HCK-Zellen von 50.000-300.000 variiert und der Durchmesser von je drei Konstrukten über den Kultivierungszeitraum verfolgt. Schließlich wurde die Zellzahl auf 250.000 HCK-Zellen im Stromabioäquivalent festgelegt. Dies entsprach ca. 1,8 Millionen Zellen, die für die oben beschriebene Herstellung der stromalen Gelmatrix einzusetzen waren.

Nach vier weiteren Tagen der submersen Kultivierung in F99 erfolgte die Aufsaat der Epithelzellen begleitet von einem Wechsel des Kultivierungsmediums. Für die Rekonstruktion der Epithelzellschicht wurden 150.000 HCE-T-Zellen vereinzelt in 50 µl Sasaki-Medium vorsichtig auf jedes Konstrukt gegeben. Um die Anheftung der Zellen an das Endothel-Stromabioäquivalent zu ermöglichen, wurde zunächst für 1 Stunde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, bevor 5 ml Sasaki-Medium pro Well ergänzt wurden. Die HCC wurden für weitere 7 Tage in Sasaki-Medium submers kultiviert, sodass die Epithelzellen einen konfluenten Monolayer ausbilden konnten. Dann wurden die Transwell-Inserts mit Hilfe einer Metallplatte an die Luft-Medium-Grenze angehoben, um die Ausbildung eines mehrschichtigen Epithels zu fördern. Die Kultivierung wurde so für weitere 10 Tage fortgesetzt, während derer die Versorgung des HCC mit Nährstoffen lediglich durch Diffusion aus dem unteren Kompartiment erfolgte, das je 3 ml Medium enthielt.

Der Austausch des Nährmediums erfolgte während der insgesamt vierwöchigen Kultivierungsdauer dreimal pro Woche.

#### **3.3.1.1.3 Variation des Aufbaus des organotypischen Cornea-Konstruktes**

Eine Variation der Herstellung des HCC wurde durch eine geänderte Reihenfolge des Aufbaus der Zellschichten bei gleichbleibender Zusammensetzung der zellulären Schichten vorgenommen. Bei dieser Herstellungsvariante konnte auf das azelluläre Bodengel verzichtet werden, da der Herstellungsprozess mit dem Aufbau der Stromabiomatrix begonnen wurde. Nach Erstarren der Stromabiomatrix wurde ebenfalls an Tag 1 der Kultivierung die Endothelzellschicht aufgebracht. Um ein Anheften der HENC-Zellen auf der Oberfläche der Stromabiomatrix zu gewährleisten, erfolgte das Ablösen der Gelmatrix vom Insert mittels Spatel erst am Folgetag. Während der folgenden 6 Tage submerser Kultivierung sorgten die inkorporierten HCK-Zellen für eine Kontraktion des Collagengels, während die Endothelzellen zu einem konfluenten Monolayer auswuchsen. Bevor an Kultivierungstag 8 die Epithelzellen aufgesät wurden, wurde das Endothel-Stromabioäquivalent mit Hilfe eines Spatels und einer Pinzette vorsichtig gewendet, sodass sich das Endothel nun unterhalb des Stromas befand. Analog zur klassischen Herstellung des HCC wurde das Cornea-Konstrukt für die Ausbildung einer konfluenten Epithelzellschicht im Anschluss für 7 Tage submers kultiviert und im Folgenden ebenfalls für 10 Tage an der Luft-Medium-Grenze gehalten.

Der Aufbau der mHCC in einer 12er-Transwell-Platte (Costar-Corning, D-Fernwald) mit einem Durchmesser von 12 mm erfolgte analog. Allerdings wurde für die Herstellung jeweils ein Drittel der oben beschriebenen Mengen verwendet. Für die submerse Kultivierung wurden pro Well 0,5 ml Medium in das Insert und 1,5 ml Medium in das unteren Kompartiment eingebracht. Die Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze erfolgt unter Verwendung von 1,5 ml Medium im unteren Kompartiment.

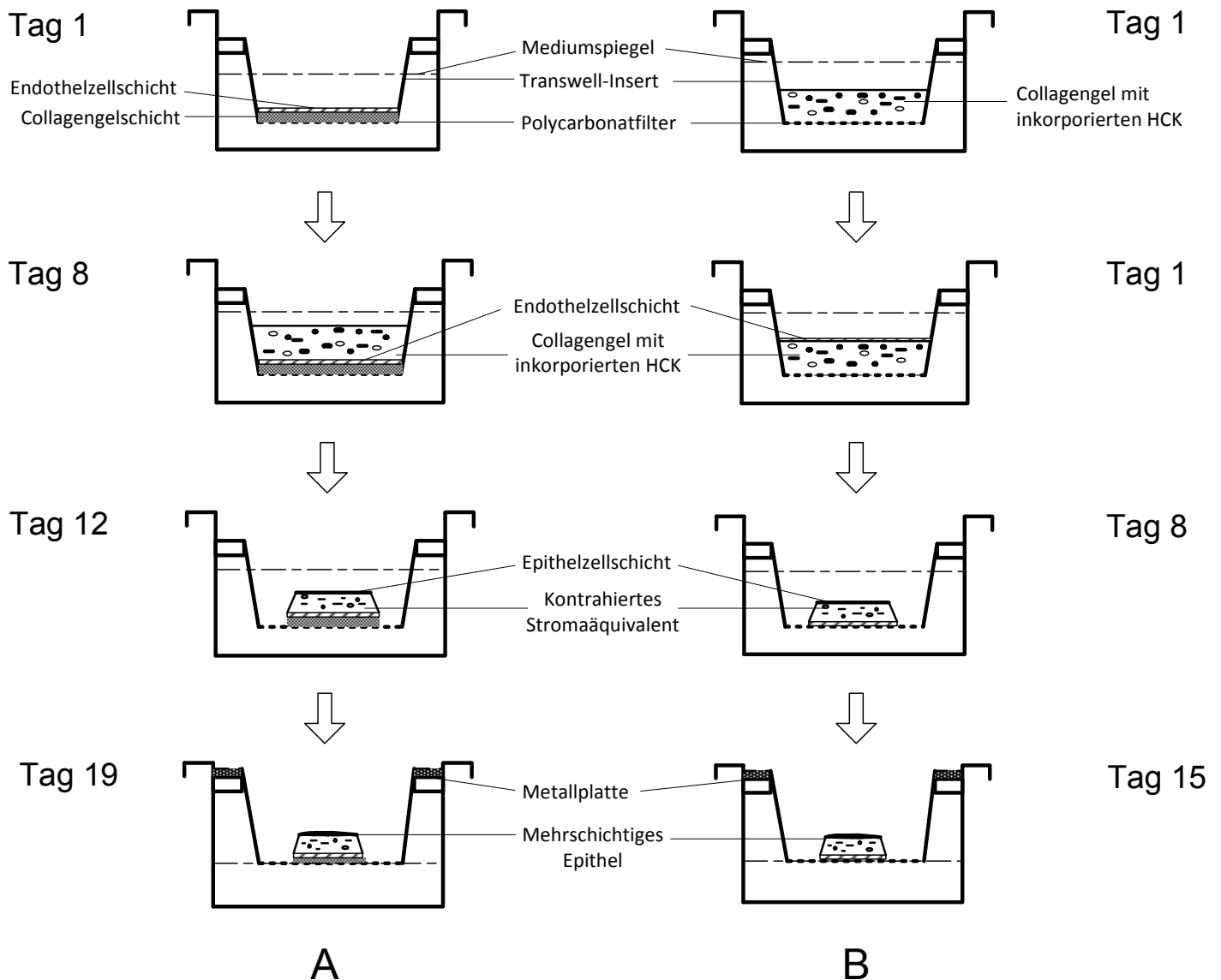


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des schrittweisen Aufbaus des Cornea-Konstruktes; A: klassischer Aufbau beginnend mit dem Endothel auf einer Collagengelschicht (Bodengel), B: Variation des Konstruktaufbaus beginnend mit dem Stroma.

#### 3.3.1.1.4 Histologische Charakterisierung

Zur histologischen Beurteilung der Cornea-Konstrukte wurden diese zunächst bei 2-8°C in einer 4%igen wässrigen, neutral phosphatgepufferten Formaldehydlösung (Roth, D-Karlsruhe) über Nacht fixiert. Danach wurden die Cornea-Konstrukte schrittweise mittels einer aufsteigenden Ethanolreihe (30%, 50%, 70%, 90% und 3x 100%) dehydratisiert. Als Einbettungsmedium wurde das kaltpolymerisierende Kunststoffharz Technovit 7100 (Heraeus-Kulzer, D-Wehrheim) verwendet. Der Einbettungsvorgang in Technovit 7100 und

das Aufblocken der ausgehärteten Polymerblöcke auf Kunststoffträger unter Verwendung von Technovit 3040 (Heraeus-Kulzer) erfolgten entsprechend der Herstelleranweisung.

Mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms (HM 355S, Microm GmbH, D-Walldorf) wurden 5 µm dicke Schnitte von den Polymerblöcken angefertigt, die anschließend mit Hämatoxylin und Eosin (H&E-Färbung) oder mit Toluidinblau und Methylenblau angefärbt wurden. Für die H&E-Färbung wurden die auf Objektträger aufgezogenen Schnitte zunächst für 20 Minuten in Hämatoxylin gefärbt und für 3 Minuten unter fließendem Wasser gebläut. Danach erfolgte die Färbung der Schnitte mit Eosin für 45 Minuten. Die Objektträger wurden kurz mit Wasser gespült und überschüssiges Eosin mit Ethanol entfernt. Bei dieser Färbung werden die Zellkerne durch Hämatoxylin blau und das Cytoplasma durch Eosin rot dargestellt [Romeis, 2010]. Bei der Übersichtsfärbung mit den Thiazinfarbstoffen Toluidinblau und Methylenblau erfolgt die Färbung der auf Objektträger aufgezogenen Schnittpräparate für 1 Minute in der auf 60°C temperierten Färbelösung (1% Toluidinblau, 1% Methylenblau, 2% Natriumtetraborat in wässriger Lösung), gefolgt von 3 minütigem Bläuen unter fließendem Leitungswasser und dem Entfernen von überschüssigem Farbstoff mit Ethanol. Die Thiazinfarbstoffe geben eine klare, kräftig blaue Kernfärbung [Romeis, 2010]. Im Anschluss an den jeweiligen Färbeprozess wurden die Schnittpräparate luftgetrocknet, mit Eukitt (Fluka, D-Seelze) eingedeckt und lichtmikroskopisch betrachtet.

### **3.3.1.2 Untersuchungen an Stromabioäquivalenten**

Um die Festigkeit des zuvor beschriebenen Cornea-Konstruktes zu erhöhen und damit die Handhabung während der In-vitro-Arzneistoffabsorptionsuntersuchungen zu erleichtern, wurde untersucht, ob die Stromabiomatrix des Cornea-Konstruktes einer Quervernetzung des Collagens durch die kombinierte Behandlung mit Riboflavin und UVA-Bestrahlung zugänglich ist. Dafür wurden, ausgehend von den zuvor beschriebenen mHCC, Stromabioäquivalente hergestellt. Diese wurden einer Riboflavin/UVA-Behandlung mit unterschiedlichen Strahlendosen unterzogen und anschließend hinsichtlich des Effektes auf

ihre oszillationsrheologischen Eigenschaften, die Zellviabilität der inkorporierten stromalen Zellen und die Molekülgröße der enthaltenen Proteine untersucht.

### **3.3.1.2.1 Kultivierung der Stromabioäquivalente**

Für die Herstellung von Stromabioäquivalenten wurde je 1 ml der unter 3.3.1.1.2 beschriebenen gerade gelierenden HCK-Zellsuspension in die Kavitäten einer 24-Well-Zellkulturplatte pipettiert und die Erstarrung abgewartet. Die Kultivierung der Stromabioäquivalente erfolgte in Medium F99 für eine Woche, wobei am zweiten Kultivierungstag das Collagengel mit Hilfe eines Spatels von der Wand des Wells gelöst wurde, um eine gleichmäßige Kontraktion zu ermöglichen. Die Stromabioäquivalente entsprachen so dem stromalen Teil der mHCC bezüglich des Stromavolumens, der HCK-Zelldichte und den Kultivierungsbedingungen mit Ausnahme des Kultivierungsgefäßes. Hier wurden Zellkulturplatten ohne Insert verwendet, da für diesen Versuchsaufbau eine Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze nicht vorgesehen war.

### **3.3.1.2.2 Riboflavin/UVA-Behandlung von Stromabioäquivalenten**

Nach siebentägiger Kultivierung wurden die Stromabioäquivalente über Nacht mit 0,1% Riboflavin-5-Phosphat (Sigma, D-Deisenhofen) im Kultivierungsmedium inkubiert. Am Folgetag wurde zunächst das riboflavinhaltige Medium entfernt, um dann die UVA-Bestrahlung der durch Riboflavin deutlich gelb gefärbten Stromabioäquivalente bei einer Wellenlänge von 365 nm mit einem Bio-Link BLX (Vilber Lourmat, F-Marne-la-Vallée) auszuführen. Das Gerät war mit fünf 8 W-Lichtquellen ausgestattet und erlaubte die Bestrahlung ganzer Zellkulturplatten, sodass die Sterilität des Kulturgutes gewährleistet blieb. Für den Bestrahlungsvorgang wurden die Zellkulturplatten in einem Abstand von 1 cm zu den Strahlungsquellen platziert. Die zu applizierende Strahlendosis konnte direkt am Gerät in der Einheit J/cm<sup>2</sup> eingestellt werden. Durch die Messung der Zeitdauer, die für verschiedene Bestrahlungsdosen erforderlich war, konnte die Bestrahlungsleistung des



Gerätes zu  $3 \text{ mW/cm}^2$  errechnet werden. Es wurden stets beide Seiten der Stromabioäquivalente nacheinander der angegebenen Bestrahlungsdosis ausgesetzt.

Um den Effekt verschieden hoher Bestrahlungsdosen zu untersuchen, wurde die Bestrahlung der Stromabioäquivalente in sich aufaddierenden Zyklen geringer Bestrahlungsdosen durchgeführt. So konnten alle Proben gleichzeitig behandelt werden, bis sie jeweils der für sie vorgesehenen Bestrahlung ausgesetzt worden waren und sie aus dem Bestrahlungsprozess entfernt wurden.

Für die im Weiteren beschriebenen Untersuchungen wurden die Bestrahlungszyklen wie folgt gewählt: Für die rheologische Untersuchung der Stromabioäquivalente und die Viabilitätsbestimmung nach einer Bestrahlung bis zu einer Dosis von  $5,0 \text{ J/cm}^2$  pro Seite wurde die Bestrahlung in Zyklen von  $1,0 \text{ J/cm}^2$  appliziert. Für die Viabilitätsbestimmung nach einer Bestrahlung bis zu einer Dosis von  $2,0 \text{ J/cm}^2$  pro Seite wurden Zyklen von  $0,25 \text{ J/cm}^2$  gewählt. Für die gelelektrophoretische Untersuchung wurde die Bestrahlung in Zyklen von  $1,0 \text{ J/cm}^2$  durchgeführt bis zu einer maximalen Dosis von  $4,0 \text{ J/cm}^2$  pro Seite.

Für die Untersuchung einer möglichen Regenerationsfähigkeit der Zellviabilität wurden alle Proben in einer kontinuierlichen Bestrahlung mit einer Dosis von  $1,5 \text{ J/cm}^2$  pro Seite bestrahlt. Einen Überblick über die verschiedenen Bestrahlungsschemata und die im Anschluss durchgeführten Untersuchungen gibt Tabelle 3.2.

Nach Abschluss des Bestrahlungsprozesses wurden die Stromabioäquivalente mit frischem Kultivierungsmedium versetzt und wieder bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\% \text{ CO}_2$  inkubiert.

### **3.3.1.2.3 Viabilitätsmessungen an Stromabioäquivalenten**

Die Zellviabilität der Stromabioäquivalente wurde 24 Stunden bzw. 1, 7, 14 und 24 Tage nach der Bestrahlung bestimmt. Dafür wurde jedes Stromabioäquivalent für 3 Stunden mit  $500 \mu\text{l}$  frischen Medium und  $70 \mu\text{l}$  einer  $0,5\%$ igen wässrigen Lösung von 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT, Sigma, D-Deisenhofen) inkubiert. Im Anschluss wurde jedes Stromabioäquivalent zweimal mit je  $1 \text{ ml}$  PBS gespült und mit je  $1000 \mu\text{l}$  Lyselösung versetzt, um das gebildete blaue Formazan über 24 Stunden unter

Lichtschutz zu extrahieren. Die Lyselösung bestand aus 0,27% Natriumdodecylsulfat (SDS, Roth, D-Karlsruhe), 0,36% Salzsäure (30-35%ig, Sigma, D-Deisenhofen), 8,82% destilliertem Wasser und 90,55% Isopropanol (Sigma).

Die Absorption von je drei Aliquoten pro Stromabioäquivalent wurde bei einer Wellenlänge von 570 nm mit dem Multiplatten-Photometer PowerWave XS bestimmt. Dabei wurden entsprechende Aliquote der Lyselösung als Blank-Korrektur verwendet. Die Zellviabilität wurde in Prozent ausgedrückt in Relation zu Absorptionswerten parallel kultivierter, nicht traumatisierter Stromabioäquivalente. Als Negativkontrolle des Assays dienten Stromabioäquivalente, die für 60 Minuten mit einer SDS-Lösung (200 µg/ml in PBS) geschädigt wurden. Diese als Kontrolle dienende Schädigung erfolgte gleichzeitig zur Riboflavin/UVA-Behandlung.

Tabelle 3.2: Überblick über die Bestrahlungsschemata der Stromabioäquivalente und die im Anschluss durchgeführten Untersuchungen.

<b>Maximale Bestrahlungsdosis</b>	<b>Bestrahlungsmodus</b>	<b>Folgende Untersuchung/en</b>
5,0 J/cm <sup>2</sup> pro Seite	Zyklen von 1,0 J/cm <sup>2</sup>	MTT-Assay nach 24 Stunden Rheologische Charakterisierung
4,0 J/cm <sup>2</sup> pro Seite	Zyklen von 1,0 J/cm <sup>2</sup>	Gelelektrophoretische Untersuchung
2,0 J/cm <sup>2</sup> pro Seite	Zyklen von 0,25 J/cm <sup>2</sup>	MTT-Assay nach 24 Stunden
1,5 J/cm <sup>2</sup> pro Seite	kontinuierlich	MTT-Assay nach 1, 7, 14, und 21 Tagen

#### **3.3.1.2.4 Rheologische Untersuchung der Stromabioäquivalente**

Um den Effekt verschieden hoher Bestrahlungsdosen auf die Festigkeit der Stromabioäquivalente zu untersuchen, wurden diese am Folgetag rheologisch untersucht im Vergleich zu parallel kultivierten Proben, die nicht der Riboflavin/UVA-Behandlung unterzogen worden waren.

Die Messungen wurden mit einem Bohlin Rheometer CVO 50 (Bohlin Instruments, GB-Gloucestershire) im Oszillationsmodus mit einer Platte-Platte-Messeinrichtung PP8 (Durchmesser der oszillierenden oberen Messplatte: 8 mm) isotherm bei 25°C durchgeführt. Die Messspaltbreite wurde auf 750 µm eingestellt. Die Messung erfolgte im linear-viskoelastischen Bereich bei einer Schubspannung von 20 Pa und einer Frequenz von 0,3 Hz. Nach einer Vorscherzeit von 2 Minuten erfolgte die eigentliche Messung über 100 Sekunden. Zur Auswertung wurden die ermittelten Messparameter komplexer Schubmodul  $G^*$ , Speichermodul  $G'$ , Verlustmodul  $G''$  und der Phasenverschiebungswinkel  $\delta$  herangezogen.

#### **3.3.1.2.5 Gelelektrophoretische Untersuchung der Stromabioäquivalente**

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde angewendet, um den Einfluss der Riboflavin/UVA-Behandlung auf das Molekulargewicht von Collagen-Proteinfragmenten zu untersuchen. Dabei wurden neben den mit unterschiedlichen Bestrahlungsdosen behandelten Stromabioäquivalenten auch unbehandelte Proben untersucht und zusätzlich solche, die lediglich mit Riboflavin inkubiert wurden, ohne eine Bestrahlung erfahren zu haben.

Je ein Stromabioäquivalent wurde in ein 1,9 ml Rotilabo-Reaktionsgefäß (Roth, D-Karlsruhe) gegeben und mit 400 µl Krebs-Ringer-Puffer (KRB) und 3,2 µl Antischaummittel (Silicone Antifoam, Sigma, D-Deisenhofen) versetzt. KRB bestand aus einer wässrigen Lösung von 6,8 g/l Natriumchlorid (Roth), 0,4 g/l Kaliumchlorid (Acros Organics, B-Geel), 0,14 g/l Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (Roth), 2,1 g/l Natriumhydrogencarbonat, 3,575 g/l HEPES (Roth), 1,1 g/l D-Glucose-Monohydrat (Fluka, D-Neu-Ulm), 0,2 g/l Magnesiumsulfat-

Heptahydrat (Acros Organics) sowie 0,26 g/l Calciumchlorid (Acros Organics) und wurde auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Nach Zugabe einer Spatelspitze Glasperlen (Durchmesser: 0,50-0,75 mm, Retsch, D-Haan) als Zerkleinerungshilfe wurden die Stromabioäquivalente mit einer Schwingmühle (MM301 Retsch, D-Haan) bei 30 Hz für 10 Minuten homogenisiert. Im Anschluss wurde der Proteingehalt mit der unter 3.2.8 beschriebenen Bradford-Bestimmung ermittelt.

Die SDS-PAGE wurde entsprechend der von Laemmli beschriebenen Methode durchgeführt [1970]. Dafür wurden die Proben im Verhältnis 1:1 mit Laemmli-2x-Puffer (Sigma) versetzt und in kochendem Wasser für 8 Minuten denaturiert. Für die Trennung wurde ein vertikales Gelelektrophorese-System (EC120, 80 × 100 mm, EC Apparatus Corp., USA-Holbrook) verwendet. Die Elektrophoresegele bestanden aus einem 5%igen Sammelgel und einem 6%igen Trenngel, die aus 30%iger Acrylamid/Bis-acrylamid-Lösung 29:1 (Sigma), 0,1% SDS, 25% Tris-Puffer (Sammelgel: 0,5 M, pH 6,8, Trenngel: 1,5 M, pH 8,8; Tris-HCl von Fluka, D-Neu-Ulm), 0,1% Ammoniumpersulfat (Sigma), 0,1% TEMED (Sigma) und demineralisiertem Wasser hergestellt wurden. In die Taschen des Sammelgels wurden Probenvolumina pipettiert, die jeweils eine Gesamtproteinmenge von 16,7 µg enthielten, um später einen Vergleich der Bandenintensitäten zu erlauben. Für eine Abschätzung der Molekulargrößen in den Proben wurde zusätzlich ein Molekülgrößenmarker (Spectra Multicolor High Range Protein Ladder, 40-300 kDa, Fermentas, D-St. Leon-Rot) auf das Gel aufgetragen. Die eigentliche gelelektrophoretische Trennung erfolgte bei 150 V, 25 W und 80 mA. Abschließend wurden die Gele zunächst für eine Stunde mit einer wässrigen Färbelösung mit 0,1% Coomassie Brilliant Blue G, 10% Eisessig und 40% Methanol (Roth) inkubiert. Dann wurde überschüssiger Farbstoff über 30 Minuten mit einer wässrigen Lösung mit 10% Eisessig und 40% Methanol entfernt.

### **3.3.1.3 Untersuchungen an Monolayerkulturen**

Um die Folgen der Kombination von Riboflavin und UVA-Bestrahlung auf corneale stromale Zellen genauer zu untersuchen, wurde die Behandlung an Monolayerkulturen der HCK-Zellen adaptiert. Nach Applikation der Noxe wurde der Einfluss auf die Viabilität der HCK-Zellkulturen und deren lichtmikroskopisches Erscheinungsbild hinsichtlich der Zellmorphologie und der Zelldichte betrachtet. Des Weiteren wurde die Beteiligung apoptotischer und nekrotischer Prozesse eingehend analysiert.

#### **3.3.1.3.1 Kultivierung der Monolayerkulturen**

Für diesen Teil der Studie wurden die HCK-Zellen in einer Dichte von 5.000 Zellen pro Well in eine 96-Well-Zellkulturplatte eingesät. Dabei wurden transparente Zellkulturplatten (TPP, CH-Trasadingen) für die Bestimmung der Zellviabilität, die mikroskopische Charakterisierung und die im Folgenden unter 3.3.1.3.7 beschriebene Apoptose-Nekrose-Fluoreszenzfärbung verwendet. Weiße Zellkulturplatten (Nunc, Thermo Fisher Scientific, DK-Roskilde) wurden für die unter 3.3.1.3.5. und 3.3.1.3.6 dargestellten lumineszenzbasierten Apoptose- bzw. Zytotoxizitätsassays genutzt. Die Zellen wurden für 3 Tage kultiviert, bevor sie der Riboflavin/UVA-Behandlung unterzogen wurden.

#### **3.3.1.3.2 Riboflavin/UVA-Behandlung der Monolayerkulturen**

Für die Riboflavin/UVA-Behandlung der Monolayerkulturen wurde zunächst das Zellkulturmedium entfernt und pro Well wurden 50 µl Medium, das mit 0,1% Riboflavin-5-Phosphat supplementiert war, ergänzt. Die Bestrahlung wurde, wie zuvor unter 3.3.1.2.2 beschrieben, mit dem Bio-Link BLX bei 365 nm mit einem Abstand der Zellkulturplatten von der Strahlungsquelle von 1 cm durchgeführt.

Für die Untersuchung der Auswirkung der Riboflavin/UVA-Behandlung auf die Zellviabilität und das lichtmikroskopische Erscheinungsbild wurden die Kulturen in Zyklen von 0,25 J/cm<sup>2</sup> bis zu einer Höchstdosis von 2,25 J/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Für die Untersuchung der Beteiligung von

apoptotischen und nekrotischen Prozessen wurden zwei Bestrahlungsschemata angewendet: Es wurden ein niedrigerer Bestrahlungsdosisbereich bis 1,5 J/cm<sup>2</sup>, der sich aus Zyklen von je 0,5 J/cm<sup>2</sup> zusammensetzte, und ein höherer Bestrahlungsdosenbereich bis 4,0 J/cm<sup>2</sup>, bei dem die Bestrahlung in Zyklen von 1,0 J/cm<sup>2</sup> durchführt wurde, betrachtet. Während des Bestrahlungsprozesses wurden jeweils die Wells der Zellkulturplatten, die keiner Bestrahlung ausgesetzt werden sollten bzw. die bereits die für sie vorgesehene Bestrahlungsdosis erreicht hatten, mit Aluminiumfolie abgedeckt. Einen Überblick über die Bestrahlungsschemata und die im Anschluss durchgeführten Untersuchungen gibt Tabelle 3.3. Unmittelbar nach Beendigung des Bestrahlungsprozesses wurde das riboflavinhaltige Medium entfernt und durch 100 µl frisches Zellkulturmedium ersetzt.

### **3.3.1.3.3 Mikroskopische Charakterisierung**

Zur Beurteilung des Einflusses der Riboflavin/UVA-Behandlung auf die Monolayerkulturen der HCK-Zellen erfolgte 24 Stunden nach der Behandlung eine lichtmikroskopische Betrachtung der Kulturen mit dem unter 3.2.7 beschriebenen Phasenkontrastmikroskop. Als Referenz wurden unbehandelte Zellen sowie durch Inkubation mit einer SDS-Lösung (100 µg/ml in PBS für 15 min) traumatisierte Zellen herangezogen. Diese Traumatisierung erfolgte ebenfalls 24 Stunden vor der Untersuchung.

### **3.3.1.3.4 Viabilitätsmessung an Monolayerkulturen**

Für die Bestimmung der Zellviabilität der HCK-Monolayerkulturen nach Riboflavin/UVA-Behandlung wurde 24 Stunden nach Einwirkung der Noxe ein MTT-Test durchgeführt. Dafür wurden die Zellen jedes Wells für 2 Stunden mit 20 µl wässriger MTT-Lösung (0,5%) in 200 µl frischem Zellkulturmedium inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gespült und das gebildete blau gefärbte Formazan wurde mit 200 µl der unter 3.3.1.2.3 beschriebenen Lyselösung über 15 Minuten unter Lichtschutz extrahiert. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 570 nm mit dem Multiplatten-Photometer PowerWave XS bestimmt. Dabei

wurden 200 µl-Aliquote der Lyselösung als Blank-Korrektur verwendet. Die Zellviabilität wurde in Prozent ausgedrückt in Relation zu Absorptionswerten nicht traumatisierter HCK-Zellen. Als Negativkontrolle des Assays dienten Zellen, die für 15 Minuten mit einer SDS-Lösung (100 µg/ml in PBS) traumatisiert wurden. Diese als Kontrolle dienende Schädigung erfolgte gleichzeitig zur Riboflavin/UVA-Behandlung.

Tabelle 3.3: Überblick über die Bestrahlungsschemata der Monolayerkulturen und die im Anschluss durchgeführten Untersuchungen.

<b>Maximale Bestrahlungs- dosis</b>	<b>Bestrahlungs- modus</b>	<b>Folgende Untersuchung/en und Zeitpunkt nach der Traumatisierung in Stunden [h]</b>	
2,25 J/cm <sup>2</sup>	Zyklen von	MTT-Assay	24 h
	0,25 J/cm <sup>2</sup>	Lichtmikroskopie	24 h
1,5 J/cm <sup>2</sup>	Zyklen von 0,5 J/cm <sup>2</sup>	Caspase 3/7-Assay	7 h und 24 h
		Zytotoxizitätsassay	7 h und 24 h
		Caspase 8-Assay	24 h
		Caspase 9-Assay	24 h
		Apoptose-Nekrose- Fluoreszenzfärbung	4 h und 7 h
4,0 J/cm <sup>2</sup>	Zyklen von 1,0 J/cm <sup>2</sup>	Caspase 3/7-Assay	7 h und 24 h
		Zytotoxizitätsassay	7 h und 24 h
		Apoptose-Nekrose- Fluoreszenzfärbung	4 h und 7 h

### 3.3.1.3.5 Apoptoseassays

Um auf die Auslösung von apoptotischen Prozessen infolge der Riboflavin/UVA-Behandlung zu prüfen, wurde der Apoptoseassay Caspase-Glo 3/7 (Promega, USA-Madison) sowohl 7 als auch 24 Stunden nach Einwirkung der Noxe durchgeführt. Dabei wurden ein niedrigerer (0-1,5 J/cm<sup>2</sup>) und ein höherer Bestrahlungsdosenbereich (0-4,0 J/cm<sup>2</sup>) betrachtet. Für den Assay wurde zunächst das Zellkulturmedium entfernt und 50 µl KRB wurden in jedes Well pipettiert, bevor je 50 µl des Caspase-Reagenzes ergänzt wurden. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten wurde das Lumineszenzsignal mit dem Multifunktionsplattenreader Genios (Tecan, CH-Männedorf) erfasst.

Zur besseren Differenzierung zu nekrotischen Prozessen wurde der im Folgenden unter 3.3.1.3.6 beschriebene Zytotoxizitätsassay CytoTox-Glo jeweils parallel auf derselben Riboflavin/UVA-behandelten Zellkulturplatte durchgeführt.

Ergänzend zum Caspase-Glo 3/7 wurden analog zur oben beschriebenen Methode die Apoptoseassays Caspase-Glo 8 (Promega) und Caspase-Glo 9 (Promega) für den niedrigeren Bestrahlungsdosenbereichs bis 1,5 J/cm<sup>2</sup> 24 Stunden nach Applikation der Riboflavin/UVA-Behandlung parallel auf derselben Zellkulturplatte durchgeführt, um eine Aussage über die Beteiligung des extrinsischen und intrinsischen Initiationswegs der Caspase-Kaskade treffen zu können.

Als Positivkontrolle für apoptotische Prozesse wurde jeweils eine Staurosporin-Lösung (10,5 µM) verwendet. Die vierstündige Inkubation erfolgte unmittelbar vor der Durchführung des Assays. Dafür wurde Staurosporin (Sigma, D-Deisenhofen) zunächst mit DMSO zu einer Stammlösung von 0,1 mg/ml gelöst. Die Stammlösung wurde unmittelbar vor der Verwendung mit Zellkulturmedium zur gewünschten Konzentration verdünnt. Als Negativkontrolle wurden jeweils Zellen, die der Standardkultivierung im Medium F99 unterlagen, betrachtet.



#### **3.3.1.3.6 Zytotoxizitätsassay**

Für die Prüfung auf einen direkt zytotoxischen Effekt der Riboflavin/UVA-Behandlung wurde der CytoTox-Glo (Promega, USA-Madison) verwendet. Dieser wurde ebenfalls sowohl 7 als auch 24 Stunden nach Einwirkung der Noxe durchgeführt. Es wurden wiederum ein niedrigerer (0-1,5 J/cm<sup>2</sup>) und ein höherer Bestrahlungsdosenbereich (0-4,0 J/cm<sup>2</sup>) untersucht. Für den Assay wurden pro Well 50 µl Assay-Reagenz zu den 100 µl Zellkulturmedium gegeben, die direkt nach der Riboflavin/UVA-Behandlung ergänzt wurden. Nach 15minütiger Inkubation wurde mit dem Multifunktionsplattenreader Genios das Lumineszenzsignal gemessen, das der Anzahl toter Zellen im Well entsprach. Anschließend wurden pro Well 50 µl Lyse-Puffer hinzugefügt und erneut für 15 Minuten inkubiert. Das dann gemessene Lumineszenzsignal gab die Gesamtzellzahl im Well an. Anhand der beiden ermittelten Werte wurde für jedes Well der prozentuale Anteil toter Zellen berechnet.

Als Positivkontrolle für einen nekrotischen Prozess wurde eine SDS-Lösung (100 µg/ml in PBS, Inkubation für 15 min) verwendet. Die Inkubation erfolgte 4 Stunden vor der Durchführung des Assays. Zellen, die nur mit dem Standardzellkulturmedium inkubiert wurden, dienten als Negativkontrolle des Assays.

#### **3.3.1.3.7 Apoptose-Nekrose-Fluoreszenzfärbung**

Für eine vergleichende Visualisierung apoptotischer und nekrotischer Prozesse in den HCK-Monolayerkulturen wurde eine Apoptose-Nekrose-Fluoreszenzfärbung 4 Stunden sowie 7 Stunden nach der Riboflavin/UVA-Behandlung durchgeführt. Dafür wurde das Apoptotic/Necrotic Cells Detection Kit der Firma PromoKine (D-Heidelberg) verwendet, das Ethidium Homodimer III (EtD) und FITC-konjugiertes Annexin V (AV) als diskriminierende Fluoreszenzfarbstoffe enthält.

Zunächst wurde der 5x Binding Buffer mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:5 verdünnt. Das Färbereagenz wurde dann durch Zugabe von je 50 µl AV- und EtD-Reagenz zu 1000 µl des einfach konzentrierten Puffers hergestellt. Für die Fluoreszenzfärbung wurden die Zellen im Well zweimal mit einfach konzentriertem Puffer gewaschen, bevor sie mit

50 µl Färbereagenz für 15 Minuten inkubiert wurden. Anschließend wurde das Färbereagenz vollständig entfernt und die Zellen erneut zweimal mit einfach konzentriertem Puffer gespült. Als Positivkontrolle für einen apoptotischen bzw. nekrotischen Prozess wurden wiederum eine Staurosporin-Lösung (10,5 µM, Inkubation für 4 h) bzw. eine SDS-Lösung (100 µg/ml in PBS, Inkubation für 15 min) verwendet. Mit dieser der Kontrolle dienenden Traumatisierung wurde 4 Stunden vor der Durchführung des Assays begonnen. Mit dem Zellkulturmedium inkubierte Zellen dienten als Negativkontrolle des Assays.

Fluoreszenzbilder wurden mit der unter 3.2.7 beschriebenen mikroskopischen Einrichtung aus dem inversen Phasenkontrastmikroskop Olympus IX50 und der Olympus XC 30-Kamera sowie der Fluoreszenzeinheit IX-FLA (Olympus, D-Hamburg) aufgenommen. Die Fluoreszenzeinrichtung war mit einer Quecksilberdampf Lampe und einem Breitband-Filterwürfel (Exzitationsfilter: 450-480 nm, Sperrfilter: 515 nm) ausgestattet.

### **3.3.2 Studienaufbau zur Stimulation der Synthese extrazellulärer Matrix in stromalen Zellen**

Diese Studie untersuchte die Fähigkeit cornealer stromaler Zellen in Langzeitkultivierung zur Synthese extrazellulärer Matrix nach Stimulation der Kulturen mit Vitamin C. Dabei wurden vergleichend native humane corneale Fibroblasten (HuFib) und immortalisierte humane corneale Keratozyten (HCK) betrachtet. Zur Charakterisierung der Langzeitkulturen wurden die Zellzahl, die Zellviabilität, der Collagengehalt und der Gehalt an Glykosaminoglykanen nach unterschiedlich langer Kultivierungsdauer untersucht. Des Weiteren wurden die Methoden SDS-PAGE in Kombination mit Western Blot sowie Immunfluoreszenz zum Nachweis von Collagen-Subtypen verwendet. Außerdem wurden die bei der Langzeitkultivierung mit Vitamin C-Supplementierung entstehenden zusammenhängenden Zellrasen hinsichtlich ihrer Lichttransmission im sichtbaren Wellenlängenbereich, ihrer biomechanischen Eigenschaften und ihrer Ultrastruktur untersucht.

Abschließend wurden zu Vergleichszwecken ausgewählte Untersuchungsmethoden an Langzeitkulturen von primären humanen Fibroblasten dermalen Ursprungs angewendet.

### **3.3.2.1 Kultivierung der stromalen Zellen**

Für die parallele Untersuchung der Zellzahl, der Zellviabilität und des Collagengehalts in der Langzeitkultivierung wurden die stromalen Zellen aus den unter 3.2.2.2 und 3.2.2.4 beschriebenen Stammkulturen beim wöchentlichen Passagieren in einer Zelldichte von 1.000 Zellen/Well in eine 24-Well-Zellkulturplatte eingesät. Die Kultivierung erfolgte über bis zu 8 Wochen ohne ein Passagieren der Kulturen mit der Supplementierung von 50 µg/ml Vitamin C (Roth, D-Karlsruhe) im Zellkulturmedium vergleichend mit der Standardkultivierung ohne Vitamin C-Zusatz. Durch die Einsaat der Zellkulturplatten mit jeweils einem zeitlichen Abstand von einer Woche konnten am Ende der Kultivierungsphase Zellkulturplatten einer unterschiedlich langen Kultivierungsdauer gleichzeitig als eine Serie betrachtet werden. Es wurden dabei je 3 Wells einer Zellkulturplatte der Bestimmung der Zellzahl, je 3 Wells der Untersuchung der Zellviabilität und je 5-6 Wells der Ermittlung des Collagengehalts zugeführt. Durch den oben beschriebenen experimentellen Ansatz unterschieden sich die Zellkulturen innerhalb einer Serie außerdem in ihrer Passagehöhe, sodass die Zellkulturplatten mit der längsten Kultivierungsdauer Zellen der niedrigsten Passage enthielten. Durch die Betrachtung mehrerer Serien, die sich geringfügig in der initialen Passagehöhe und der Kultivierungsdauer unterschieden (Kultivierungszeitraum 1-6, 1-7, 3-9 oder 1-10 Wochen), konnte der Einfluss der Zellpassage auf den Collagengehalt bei gleichlanger Kultivierungsdauer ermittelt werden. Im Falle der HuFib-Zellen wurden insgesamt acht und im Falle der HCK-Zellen fünf Serien durchgeführt.

Für die Bestimmung des Gehalts an Glykosaminoglykanen wurden die Zellen ebenfalls in einer Dichte von 1.000 Zellen/Well in eine 24-Well-Zellkulturplatte eingesät und über mehrere Wochen mit oder ohne Vitamin C-Zusatz zum Standardmedium kultiviert. Die Zellkulturplatten wurden nach 1, 3, 4, 6 und 7 Wochen der Bestimmung des Glykosaminoglykangehalts zugeführt (je 6 Wells). Es erfolgte jeweils parallel eine Bestimmung der Zellzahl in je 6 Wells, um eine Normierung des Glykosaminoglykangehalts auf die Zellzahl zu ermöglichen.

Für die Untersuchung von exprimierten Collagentypen mittels Immunfluoreszenz wurden die stromalen Zellen in einer Dichte von 1.000 Zellen/Well in eine 8-Well-Zellkulturkammer mit einem Deckglas-Boden (Sarstedt, D-Nümbrecht) eingesät und für 1 bzw. 3 Wochen jeweils vergleichend mit oder ohne Vitamin C-Supplementierung kultiviert.

Für die SDS-PAGE und Western Blot-Untersuchung wurden je 750.000 HuFib- bzw. HCK-Zellen in eine 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche (Sarstedt) eingesät und über 6 Wochen mit oder ohne Vitamin C-Supplementierung kultiviert.

Um für die Charakterisierung der biomechanischen Eigenschaften, die Bestimmung der Lichttransmission und die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung ablösbare, ausreichend stabile Zellrasen zu erhalten, wurden wiederum je 750.000 stromale Zellen in eine 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche (Sarstedt) eingesät und während der mehrwöchigen Kultivierung mit Vitamin C supplementiert. Nach einer Kultivierungsdauer von 5-14 Wochen wurden die biomechanischen Eigenschaften in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer analysiert. Für die Bestimmung der Lichttransmission und die Rasterelektronenmikroskopie wurden 8 Wochen alte Kulturen verwendet.

Einen Überblick über den Aufbau der Studie und die verschiedenen Kultivierungsprotokolle gibt Tabelle 3.4.

### **3.3.2.2 Proliferationsuntersuchung**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen im Well der Zellkulturplatte mit 1 ml PBS gewaschen und durch eine 4-6 minütige Inkubation mit 500 µl einer Trypsin (0,05%)-EDTA (0,02%)-Lösung von der Kultivierungsoberfläche abgelöst. Die Trypsinisierung wurde durch Zugabe von 500 µl des Standardkultivierungsmediums gestoppt. Nach Vereinzelung der Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurde die Zellzahl mit dem unter 3.2.4 beschriebenen Verfahren mittels Coulter Counter bestimmt.

Tabelle 3.4: Überblick über den Aufbau und die Kultivierungsprotokolle der Studie zur Stimulation der Synthese extrazellulärer Matrix in stromalen Zellen ( $\pm$ : vergleichende Kultivierung mit und ohne Vitamin C-Zusatz; +: Kultivierung mit Vitamin C-Zusatz).

Kultur- gefäß	Einsaat	Vitamin C- Zusatz	Kultivierungs- dauer	Untersuchung
24-Well- Zellkultur- platte	1.000 Zellen/ Well	$\pm$	z.B. 2-8 Wochen	Zellzahl
				Zellviabilität
				Collagengehalt
			1, 3, 4, 6 und 7 Wochen	Glykosaminoglykangehalt
8-Well- Zellkultur- kammer	1.000 Zellen/Well	$\pm$	1 und 3 Wochen	Immunfluoreszenz Collagen Typ I
			3 Wochen	Immunfluoreszenz Collagen Typ III
75 cm <sup>2</sup> - Zellkultur- flasche	750.000 Zellen	$\pm$	6 Wochen	SDS-PAGE und Western Blot Collagen Typ I
				SDS-PAGE und Western Blot Collagen Typ III
		+	8 Wochen	Lichttransmission
				Rasterelektronenmikroskopie
			5-14 Wochen	Materialprüfung

### 3.3.2.3 Bestimmung der Zellviabilität

Die Zellviabilität wurde mittels MTT-Test ermittelt. Dafür wurden die Zellen im Well für 2 Stunden mit 50  $\mu$ l wässriger MTT-Lösung (0,5%) in 500  $\mu$ l Medium inkubiert. Nach Spülen mit 1 ml PBS und Zugabe von 1000  $\mu$ l der unter 3.3.1.2.3 beschriebenen Lyselösung erfolgte die Extraktion des gebildeten blauen Formazans über 15 Minuten unter Lichtschutz. Die Absorptionsmessung von 100  $\mu$ l-Aliquoten bei einer Wellenlänge von 570 nm wurde als Dreifachbestimmung mit dem Multiplatten-Photometer PowerWave XS durchgeführt. 100  $\mu$ l-

Aliquote der Lyselösung wurden zur Blank-Korrektur herangezogen. Die Auswertung erfolgte als graphische Darstellung der Absorptionswerte über die Kultivierungsdauer.

### 3.3.2.4 Bestimmung des Collagengehalts

Zur Bestimmung des Collagengehalts wurde die Picrosirius Red-Färbung analog zu der von Tullberg-Reinert und Jundt beschriebenen Methode verwendet [1999]. Zunächst wurden die Zellen im Well mit 1 ml PBS gespült und für 1 Stunde mit 1 ml Bouins-Lösung fixiert. Die Fixierlösung bestand aus 10 ml Eisessig, 150 ml gesättigter wässriger Pikrinsäurelösung (Sigma, D-Deisenhofen) und 50 ml Formaldehyd-Lösung (35%ig, Roth). Nach Abnahme der Fixierlösung wurden die Zellkulturplatten für 15 Minuten unter fließendem Wasser gespült. Die Picrosirius Red-Färbung erfolgt über 1 Stunde durch Inkubation mit 0,1% Sirius Red (Sigma) in gesättigter wässriger Pikrinsäurelösung. Ungebundener Farbstoff wurde durch dreimaliges Waschen mit 0,01 N Salzsäure entfernt, bevor der gebundene Anteil des Farbstoffs durch einstündige Inkubation mit 1000 µl 0,1 N Natronlauge (Sigma) extrahiert wurde. Je drei 100 µl-Aliquote wurden in 96-Well-Zellkulturplatten (TPP; CH-Trasadingen) überführt, und die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 550 nm mit dem Multiplatten-Photometer PowerWave XS gegen 0,1 N Natronlauge als Blank gemessen.

Zur Quantifizierung wurde eine Kalibrierung mit einer Collagenlösung, die nach der unter 3.3.1.1.1 beschriebenen Methode gewonnen wurde, in dem Konzentrationsbereich von 0-37,5 µg/100 µl vorgenommen. Dafür wurde die Collagenkonzentrationsreihe als Dreifachbestimmung in die Wells einer 96-Well-Zellkulturplatte pipettiert und über Nacht eintrocknen lassen. Die Sirius-Red-Färbung erfolgte dann analog zur oben beschriebenen Methode mit 100 µl Färbelösung, 200 µl 0,1 N Natronlauge zur Extraktion des gebundenen Farbstoffanteils und der Messung der Absorption von 100 µl-Aliquoten bei 550 nm.

### **3.3.2.5 Bestimmung des Glykosaminoglykangehalts**

Zur Bestimmung des Glykosaminoglykangehalts wurde die von Farndale et al. beschriebene Methode modifiziert [1982, 1986]. Die Zellen in den Wells wurden zunächst zweimal mit PBS gespült und nach Zugabe von 1000 µl Papain-Reagenz für 3 h bei 65°C im Wärmeschrank inkubiert, um die Glykosaminoglykane zu lösen und störende Proteine zu entfernen. Das Papain-Reagenz war zusammengesetzt aus 100 ml 0,2 M Phosphatpuffer (pH 6,4; hergestellt aus Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat und wasserfreiem Natriummonohydrogenphosphat, Roth, D-Karlsruhe), 0,01 M Natrium-EDTA (Sigma, D-Deisenhofen), 0,1 M Natriumacetat (Roth), 0,005 M Cysteinhydrochlorid (Sigma) und 80 µl Papain-Suspension (Sigma). Pro Well wurde ein 100 µl-Aliquot entnommen und in einem Rotilabo-Reaktionsgefäß für 30 Minuten mit 1000 µl des Farbstoffreagenzes versetzt, das sich aus 4 mg Dimethylmethylenblau (Sigma), 0,474 g Natriumchlorid, 0,608 g Glycin (Sigma), 19 ml 0,1 N Salzsäure und 181 ml demineralisiertem Wasser zusammensetzte. Das sich bildende Präzipitat wurde bei 20.000 rpm für 10 min abzentrifugiert (Allegra 64R Zentrifuge, Beckman Coulter, D-Krefeld) und in 1000 µl der unter 3.3.1.2.3 beschriebenen Lyselösung aufgenommen. Die Absorptionsmessung von 200 µl-Aliquoten erfolgte bei einer Wellenlänge von 656 nm mit dem Multiplatten-Photometer PowerWave XS gegen 200 µl Lyselösung als Blankkorrektur.

Zur Quantifizierung wurde eine Verdünnungsreihe von Chondroitinsulfat (Sigma) in Papain-Reagenz im Bereich von 0-10 µg/100 µl hergestellt, die parallel der oben beschriebenen Methode unterzogen wurde.

### **3.3.2.6 Gelelektrophoretische Untersuchung**

SDS-PAGE wurde durchgeführt, um die Proteine der Proben nach ihrer Molekülgröße aufzutrennen, den Anteil von Collagen bezogen auf den Gesamtproteingehalt der Proben zu vergleichen, und um in einem nachgeschalteten Western Blot-Experiment beteiligte Collagentypen zu identifizieren. Dafür wurden die Zellrasen mit Hilfe eines Zellschabers (TPP, CH-Trasadingen) abgelöst und in ein Rotilabo-Reaktionsgefäß überführt. Nach

Zugabe von 500 µl 3%iger Essigsäure, 5 µl Antischaummittel und einigen Glasperlen als Homogenisierungshilfe erfolgte die Zerkleinerung mit der bereits unter 3.3.1.2.5 genannten Schwingmühle bei 30 Hz für 10 Minuten. Die Proben wurden über Nacht leicht agitiert (Schüttler MS 3 basic, IKA, D-Staufen), um das Lösen des Collagens zu erleichtern.

Um die Proben hinsichtlich des Anteils an Collagen bei gleichem Gesamtproteingehalt vergleichen zu können, wurde am Folgetag der Gesamtproteingehalt der Proben mit der unter 3.2.8 beschriebenen Methode bestimmt. Im Anschluss wurden die Proben im Verhältnis 1:1 mit Laemmli-2x-Puffer versetzt und entweder in kochendem Wasser für 8 Minuten denaturiert oder aber bei Raumtemperatur belassen. Probenvolumen mit einer Gesamtproteinmenge von 3 µg wurden in die Taschen des Gels aufgetragen, das aus einem 5%igen Sammelgel und einem 7,5%igen Trenngel bestand.

Bei der gelelektrophoretischen Untersuchung mit nachfolgender Western Blot-Analytik wurde für die HuFib-Zellen der Zellrasen von je einer Kulturflasche und für die HCK-Zellen die Zellrasen von je drei Kulturflaschen dem oben beschriebenen Aufschluss unterzogen. Für eine schärfere Bandentrennung wurden alle Proben nach dem Versetzen mit dem gleichen Volumen an Laemmli-2x-Puffer für 8 Minuten in siedendem Wasser denaturiert. Bei diesem Experiment wurden jeweils 10 µl, 15 µl und 20 µl Probenvolumen in die Taschen des Gels aufgetragen.

Die Herstellung der Gele erfolgte mit den unter 3.3.1.2.5 genannten Reagenzien. Als Molekülgrößenmarker wurden Spectra Multicolor Protein Marker (Broad Range:10-260 kDa, High Range: 50-300 kDa, Fermentas, D-St. Leon-Rot) verwendet. Die Trennung erfolgte mit einem vertikalen Gelelektrophorese-System (MiniVE SE300, 100 × 100 mm, Hoefer, USA-San Francisco) bei 180 V, 80 mA und 25 W. Nach der gelelektrophoretischen Trennung wurden die Gele nach der unter 3.3.1.2.5 beschriebenen Methode mit Coomassie gefärbt oder der im Folgenden unter 3.3.2.7 beschriebenen Western Blot-Analytik unterzogen.



### 3.3.2.7 Western Blot

Die durch SDS-PAGE getrennten Proteine wurden mit dem Perfect-Blue Tank-Elektroblotter Web S (peqlab, D-Erlangen) bei 80 V, 280 mA und 25 W über 150 Minuten auf eine PVDF-Membran (peqlab, Porengröße 0,45 µm) übertragen. Der Transferpuffer (pH 8,3) enthielt 25 mM Tris-Base (Sigma, D-Deisenhofen), 192 mM Glycin und 0,2% SDS. Im Anschluss wurden unspezifische Bindestellen durch einstündige Inkubation mit einem Puffer (MPBST), der aus 5% Magermilchpulver (Sigma) und 0,05% Tween 20 (Sigma) in PBS bestand, blockiert. Als primäre Antikörper wurden ein in Kaninchen produzierter polyklonaler Antikörper gegen die  $\alpha 2$ -Untereinheit des humanen Collagen Typ I (Sigma) und ein ebenfalls in Kaninchen produzierter polyklonaler Antikörper gegen humanes Collagen Typ III (Sigma) eingesetzt. Ein in Ziegen erzeugter, mit Meerrettich-Peroxidase konjugierter Anti-Kaninchen-Antikörper (Calbiochem, D-Schwalbach) wurde als sekundärer Antikörper verwendet. Der primäre Antikörper wurde mit MPBST im Verhältnis 1:750 verdünnt und die Membran wurde damit über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0,05% Tween 20 in PBS für jeweils 10 Minuten erfolgte die Inkubation mit dem mit MPBST im Verhältnis 1:5000 verdünnten sekundären Antikörper für 1 Stunde. Nach erneut dreimaligem Spülen mit PBS erfolgte die Detektion mit einem Chemilumineszenz-Detektionskit (Lumi-Light<sup>PLUS</sup>, Roche Diagnostics, D-Mannheim) und einem Lumineszenzimager (Gel iX, Intas, D-Göttingen). Mit Hilfe der zugehörigen Software konnte eine Aufnahme der Banden des Proteinmarkers in das Lumineszenzbild eingefügt werden, um eine Zuordnung zur Molekülgröße vornehmen zu können.

### 3.3.2.8 Immunfluoreszenz

Die Zellen in den Zellkulturkammern wurden zunächst mit PBS gespült und über 1 Stunde mit Ethanol fixiert. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden die fixierten Zellen über Nacht bei 4°C mit einer 5%igen Lösung von Rinderserumalbumin in PBS inkubiert.

Zur Detektion von Collagen Typ I wurde ein in Mäusen produzierter, monoklonaler Antikörper gegen humanes Collagen Typ I (Millipore, D-Schwalbach) verwendet. Entsprechend der

Herstellerangabe wurde der lyophilisierte Antikörper mit destilliertem Wasser zu einer Konzentration von 100 µg/ml rekonstituiert und in Aliquoten bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Direkt vor Gebrauch wurde der Antikörper im Verhältnis 1:5 mit Dako REAL Antibody Diluent (Dako, D-Hamburg) verdünnt. Als sekundärer Antikörper wurde ein in Ziegen produzierter, mit FITC konjugierter Anti-Maus-IgG-Antikörper (Millipore) verwendet. Dieser wurde unmittelbar vor Verwendung im Verhältnis 1:100 mit Dako REAL Antibody Diluent verdünnt. Der bereits unter 3.3.2.7 beschriebene in Kaninchen produzierte polyklonale Antikörper gegen humanes Collagen Typ III (1 mg/ml), mit Dako REAL Antibody Diluent im Verhältnis 1:300 verdünnt, und ein sekundärer, in Ziegen erzeugter Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Sigma), der ebenfalls mit FITC konjugiert war und vor Gebrauch im Verhältnis 1:100 verdünnt wurde, wurden für die Detektion von Collagen Typ III eingesetzt.

Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte jeweils über Nacht bei 4°C. Die Inkubationszeit für den sekundären Antikörper betrug jeweils 1 Stunde. Vor und nach jedem Inkubationsschritt wurden die Zellen gründlich mit PBS und destilliertem Wasser gespült. Zur Überprüfung der Funktionalität der Antikörper wurden Gefrierschnitte (Kryostat Microm HM 550, Thermo Scientific, D-Dreieich) von humanem Stomachgewebe, die auf Objektträger übertragen wurden, parallel mit den jeweiligen Antikörper-Lösungen inkubiert. Mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Nikon A1, Nikon, D-Düsseldorf) wurde nach Anregung des Fluorophors bei 488 nm die Fluoreszenz der Proben in dem Emissionswellenlängenbereich von 500-550 nm beurteilt. Zur Kontrolle der Hintergrundfluoreszenz wurden jeweils Proben mitgeführt, die unter denselben Bedingungen dem Färbeprozess unterzogen wurden, aber während des ersten Färbeschrittes anstatt mit der Verdünnung des primären Antikörpers ausschließlich mit Dako REAL Antibody Diluent inkubiert wurden.

### 3.3.2.9 Lichttransmission

Die durch achtwöchige Kultivierung mit Vitamin C entstandenen zusammenhängenden Zellrasen, sog. Zellsheets, wurden einer Bestimmung ihrer Transmissionseigenschaften im Bereich des sichtbaren Lichtes unterzogen, indem ihre Absorption im Bereich von 400-800 nm mit dem Multiplatten-Photometer PowerWave XS bestimmt wurde. Der Abstand der Messpunkte betrug dabei 1 nm. Für die Untersuchung wurden die Zellsheets von der Kultivierungsfläche abgelöst und vorsichtig mit Hilfe einer feinen Pinzette in eine Konstruktion, bestehend aus einem äußeren Metall- und einem inneren Kunststoffring, eingespannt. Diese Ringkonstruktionen wurden in die Wells einer 24-Well-Zellkulturplatte gegeben, die je 1000 µl PBS enthielten. Die Absorption  $A$  wurde gegen 1000 µl PBS als Blankkorrektur vermessen. Die ermittelten Absorptionswerte wurden anhand des folgenden mathematischen Zusammenhangs (Gleichung 1) in eine prozentuale Transmission  $T$  umgerechnet:

Gleichung 1: 
$$T = \left( \frac{I}{I_0} \right)$$

$$A = \lg \left( \frac{I_0}{I} \right) = -\lg \left( \frac{I}{I_0} \right) = -\lg(T)$$

$$\rightarrow T [\%] = 100 \times (10^{-A})$$

$A$  : Absorption  
 $I_0$  : Intensität des einfallenden Lichtstrahls  
 $I$  : Intensität des austretenden Lichtstrahls  
 $T$  : Transmission

### 3.3.2.10 Rasterelektronenmikroskopie

Zur Betrachtung ihrer Ultrastruktur wurden die Zellsheets zunächst über 90 Minuten mit einer Lösung von 4% Glutaraldehyd (Sigma, D-Deisenhofen) in PBS fixiert, mit PBS gewaschen und für 2 Stunden mit einer wässrigen 2%igen Osmiumtetroxidlösung (Roth, D-Karlsruhe) nachfixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellsheets durch eine aufsteigende Ethanolreihe (30%, 50%, 70%, 90% und 3x 100%) entwässert und luftgetrocknet. Anschließend wurden die Proben in einer Sputteranlage (SCD 030, Balzer, D-Wiesbaden) unter einer Argonatmosphäre mit Gold bedampft. Die Ultrastruktur der Proben

wurde mit einem Rasterelektronenmikroskop (Leo 1550, Zeiss, D-Oberkochen) dargestellt. Zur Abschätzung der Dicke der erkennbaren Fibrillen wurde die Mikroskop-Software cell<sup>F</sup> (Olympus, D-Hamburg) eingesetzt.

### 3.3.2.11 Materialprüfung

Die biomechanischen Eigenschaften der Zellsheet wurden in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer anhand von Zugprüfungen untersucht, die mit einer statischen Materialprüfmaschine mit einem Kraftaufnehmer bis 10 N (zwicki-Line Z 0.5, Zwick, D-Ulm) und der zugehörigen Software testeXpert II (Zwick) durchgeführt wurden. Es wurden dafür der Elastizitätsmodul (E-Modul) und die Zugfestigkeit als Kenngrößen betrachtet. Der E-Modul ist ein Maß für die Verformbarkeit eines Körpers. Er gibt an, wieviel Kraft benötigt wird, um einen Körper um eine bestimmte Länge zu dehnen. Er entspricht der Steigung im linear elastischen Verformungsbereich des Spannungsdehnungsdiagramms und ist als Proportionalitätsfaktor eine Stoffkonstante [Martin und Leuenberger, 2002; Stieß, 1994]. Die Zugfestigkeit hat die Einheit einer Spannung und ergibt sich aus der Normierung der bei Bruch der Probe gemessenen Maximalkraft auf die ursprüngliche Querschnittsfläche der Probe [Stieß, 1994].

Für die Materialprüfung wurden die Zellsheets zunächst von der Kultivierungsfläche abgelöst und vorsichtig mit Hilfe einer feinen Pinzette auf einem mit PBS getränkten Instrumentenwischtuch (M.E.B. Medical Products, D-Karlstein) ausgebreitet, um ein Austrocknen der Zellsheets während der Probenpräparation und der eigentlichen Messung zu verhindern. Mittels einer Stanze wurden Schulterproben mit einer Stegbreite von 2 mm und eine Steglänge von 14 mm erzeugt. Diese Schulterproben wurden in die Probenhalter der Materialprüfmaschine eingespannt. Vor Beginn der Messung wurde das als Träger verwendete Instrumentenwischtuch durchtrennt, um die biomechanischen Eigenschaften der Zellsheets messen zu können. Die Prüfgeschwindigkeit betrug 5 mm/min für die Bestimmung des E-Moduls und 25 mm/min für die Messung der Maximalkraft. Für die Berechnung des E-Moduls aus der Spannungs-Dehnungskurve und der Zugfestigkeit aus der erreichten

Maximalkraft wurde die jeweilige Probendicke anhand von Kryomikrotomschnitten (Microm HM 550, Thermo Scientific, D-Dreieich) der Zellsheets, die über Nacht bei 2-8°C in einer 4%igen wässrigen, neutral phosphatgepufferten Formaldehydlösung fixiert wurden, und der Mikroskop-Software cell<sup>F</sup> ermittelt.

### **3.3.2.12 Ergänzende Untersuchungen an humanen dermalen Fibroblasten**

Für eine vergleichende Betrachtung wurden ausgewählte Untersuchungsmethoden, die einen Hinweis über den Ordnungszustand der Collagenfibrillen geben, an Zellsheets durchgeführt, die von humanen Fibroblasten dermalen Ursprungs durch Supplementierung des Zellkultmediums mit Vitamin C gebildet wurden.

#### **3.3.2.12.1 Langzeitkultivierung von humanen dermalen Fibroblasten**

Die HDF-Zellen wurden analog der Langzeitkultivierung der cornealen stromalen Zellen über mehrere Wochen mit dem Zusatz von 50 µg/ml Vitamin C zu ihrem Standardzellkulturmedium kultiviert. Die Einsaatdichte betrug ebenfalls 750.000 Zellen pro 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche (Sarstedt, D-Nümbrecht). Nach einer Kultivierungsdauer von 8 Wochen wurden die dermalen Zellsheets vorsichtig von der Kultivierungsoberfläche abgelöst und den im Folgenden aufgeführten Untersuchungen zugeführt.

#### **3.3.2.12.2 Lichttransmission**

Die Untersuchung der Lichttransmission von dermalen Zellsheets wurde entsprechend der unter 3.3.2.9 beschriebenen Methode durchgeführt.

#### **3.3.2.12.3 Rasterelektronenmikroskopie**

Die Charakterisierung der dermalen Zellsheets mittels Rasterelektronenmikroskopie erfolgte nach der unter 3.3.2.10 beschriebenen Methode.

#### **3.3.2.12.4 Materialprüfung**

Die Betrachtung der biomechanischen Eigenschaften der über 8 Wochen kultivierten dermalen Zellsheets erfolgte anhand der unter 3.3.2.11 beschriebenen Methode.

### **3.4 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Microsoft Excel 2007. Zur Prüfung auf Homogenität der Streuung wurde zunächst ein F-Test durchgeführt. Die Überprüfung der Daten auf signifikante Unterschiede erfolgte dann mit einem zweiseitigen Zwei-Stichproben-t-Test. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\leq 5\%$  wurden die Unterschiede als statistisch signifikant angesehen [Bauer et al., 2012].

Die Ergebnisse der Bestimmung der Lichttransmission werden als Mittelwert  $\bar{x}$  je Messpunkt dargestellt. Die Darstellung der Messwerte der übrigen Untersuchungen erfolgt als Mittelwert  $\bar{x} \pm$  Standardabweichung  $sd$ .

## 4 Versuchsergebnisse und Diskussion

### 4.1 Studie zur Verfestigung der Biomatrix eines Cornea-Konstruktes für In-vitro-Arzneistoffabsorptionsuntersuchungen

Die hier im Folgenden vorgestellten Ergebnisse behandeln Modifikationen und Untersuchungen zur Verfestigung der Biomatrix eines humanen Cornea-Konstruktes für In-vitro-Arzneistoffabsorptionsuntersuchungen, das bereits in der Arbeitsgruppe etabliert worden war [Reichl, 2003; Reichl et al., 2004]. Dieses humane Cornea-Konstrukt wurde unter Verwendung der immortalisierten humanen Epithelzelllinie CEPI, der immortalisierten humanen Endothelzelllinie HENC und primären humanen Fibroblasten in einer Collagenmatrix aufgebaut. Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass auch die immortalisierte humane corneale Epithelzelllinie HCE-T für den Aufbau des Cornea-Konstruktes geeignet ist, und dass das Cornea-Modell außerdem für Zytotoxizitätsuntersuchungen herangezogen werden kann [Reichl, 2008; Döhring, 2009]. Der Vorteil der Verwendung von HCE-T-Zellen gegenüber der CEPI-Zelllinie liegt in der besseren Ausprägung der epithelialen Barriere durch die Ausbildung von dichten tight junctions, was insbesondere für die Permeation von hydrophilen Stoffen von großer Bedeutung ist [Reichl, 2008]. Außerdem ist die HCE-T-Zelllinie kommerziell verfügbar und in der Literatur bereits eingehend charakterisiert [Araki-Sasaki et al., 1995; Toropainen et al., 2001; Becker et al., 2007]. Bei dem Austausch der CEPI-Zellen durch HCE-T-Zellen konnte allerdings beobachtet werden, dass nach Aufsaat der Epithelzellen eine weitere Kontraktion der collagenhaltigen Stromabiomatrix ausblieb. Diese Beobachtung wurde vor allem auf den dabei vorgenommenen Wechsel des Kultivierungsmediums zum Sasaki-Medium zurückgeführt, im Speziellen auf das in diesem Medium enthaltene Supplement Choleratoxin [Döhring, 2009]. Choleratoxin bewirkt über eine Erhöhung der intrazellulären cyclischen AMP-Konzentration eine Wachstumsförderung der Epithelzellen bei gleichzeitiger Wachstumshemmung der Fibroblasten [Taylor-Papadimitriou et al., 1980]. Als Supplement

im Zellkulturmedium kann es folglich unterstützend wirken bei der Gewinnung reiner Epithelzellkulturen aus Geweben, da hier das Überwuchern der ausgewachsenen Epithelzellen mit Fibroblasten ein Problem darstellt [Freshney, 2005]. Die festgestellte beeinträchtigte Kontraktion der Gelmatrix des HCC führte zu einer geringen Festigkeit [Döhring, 2009]. Die HCC werden bei den In-vitro-Arzneistoff-absorptionsuntersuchungen einer hohen mechanischen Belastung ausgesetzt, indem sie zwischen Donor- und Akzeptorkompartiment modifizierter Franzzellen eingebracht werden. Deswegen kann es aufgrund ungenügender Festigkeit zu einem weiten Eindringen der Cornea-Konstrukte in das Donorkompartiment kommen, was mit einer Vergrößerung der Diffusionsstrecke einhergeht, oder es kann gar ein Kollabieren der Konstrukte während des Experiments auftreten [Döhring, 2009]. In beiden Fällen würde das Ergebnis durch eine veränderte Menge an permeiertem Arzneistoff verfälscht, sodass die ermittelten Daten nicht repräsentativ wären. Aus diesem Grund wurde eine Verfestigung der collagenhaltigen Biomatrix des Cornea-Konstruktes angestrebt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Eignung der in der Ophthalmologie angewendeten Methode des Riboflavin/UVA-Crosslinkings zur Erhöhung der biomechanischen Festigkeit des Cornea-Konstruktes eingehend untersucht. Zunächst wurde jedoch das Kultivierungsprotokoll der HCC für die Verwendung der immortalisierten HCK-Zelllinie als stromale Zellen angepasst. Diese Umstellung wurde vorgenommen, um die Standardisierbarkeit und Reproduzierbarkeit des Modells weiter zu erhöhen, da der Aufbau des HCC dann ausschließlich unter Verwendung von immortalisierten Zelllinien erfolgte. Diese Zelllinien bieten im Gegensatz zu Primärzellen, die aus humanem Spendergewebe isoliert werden und nach wenigen Passagen in die Seneszenz übergehen, den Vorteil, dass sie kontinuierlich wachsen und keine Alterungsprozesse zeigen, sodass sie ein nahezu unbegrenztes, gleichbleibendes Zellreservoir darstellen.

Hahne und Reichl konnten zeigen, dass der Zusatz von Cholera toxin nicht essentiell ist für die Ausbildung der tight junction-Barriere in HCE-T-Zellen [2011]. Im Gegensatz dazu war der Zusatz von DMSO zum serumhaltigen Sasaki-Medium bedeutend für diese Barriere. Der Zusatz von DMSO zum serumfreien KGM-Medium führte zwar initial zu einer Stärkung der



epithelialen Barriere, allerdings war dieser Effekt nicht dauerhaft ausgeprägt [Hahne und Reichl, 2011]. Aufgrund des fehlenden Einflusses von Choleratoxin auf die Ausbildung der Barriereigenschaften wurde für die serumhaltige Kultivierung des HCC in dieser Studie auf den Zusatz von Choleratoxin im Sasaki-Medium verzichtet. Außerdem wurde ein weiteres Angleichen der Medien von endothelialen, stromalen und epithelialen Zellen durch die Supplemente EGF, DMSO und Insulin angestrebt, um durch den Medienwechsel während der Kultivierung des HCC eine geringere Wachstums hemmung und eine weniger beeinträchtigte Gelkontraktion, die zu einer geringeren mechanischen Festigkeit des HCC führen würde, zu verursachen.

#### **4.1.1 Kultivierung der cornealen Zellen**

##### **4.1.1.1 Immortalisierte humane corneale Epithelzellen – HCE-T**

Die immortalisierte HCE-T-Zelllinie zeigte das für Epithelzellen typische kopfsteinpflasterartige Erscheinungsbild. Durch die Immortalisierung bildeten die Zellen im konfluenten Zustand eine hohe Sättigungsdichte aus. Die Kultivierung der Zellen unter Entzug des Supplements Choleratoxin aus dem von Araki-Sasaki et al. beschriebenen Medium hatte keinen erkennbaren Einfluss auf das Wachstumsverhalten und die Morphologie der HCE-T-Zellen (Abbildung 4.1) [1995].

##### **4.1.1.2 Immortalisierte humane corneale Keratozyten – HCK**

Die immortalisierte Keratozyten-Zelllinie HCK zeichnete sich durch eine in-vivo-ähnlich abgeflachte Morphologie aus. Durch das kontinuierliche Wachstum bildeten sie im konfluenten Stadium einen sehr dichten Monolayer aus, der ihnen ein eher pflastersteinartiges Erscheinungsbild verlieh. Der Zusatz der physiologischen Supplemente EGF und Insulin zu ihrem Standardkultivierungsmedium F99 rief keine Beeinträchtigung der Proliferation und der Morphologie hervor. Demgegenüber führte die Adaption der HCK-Zellen

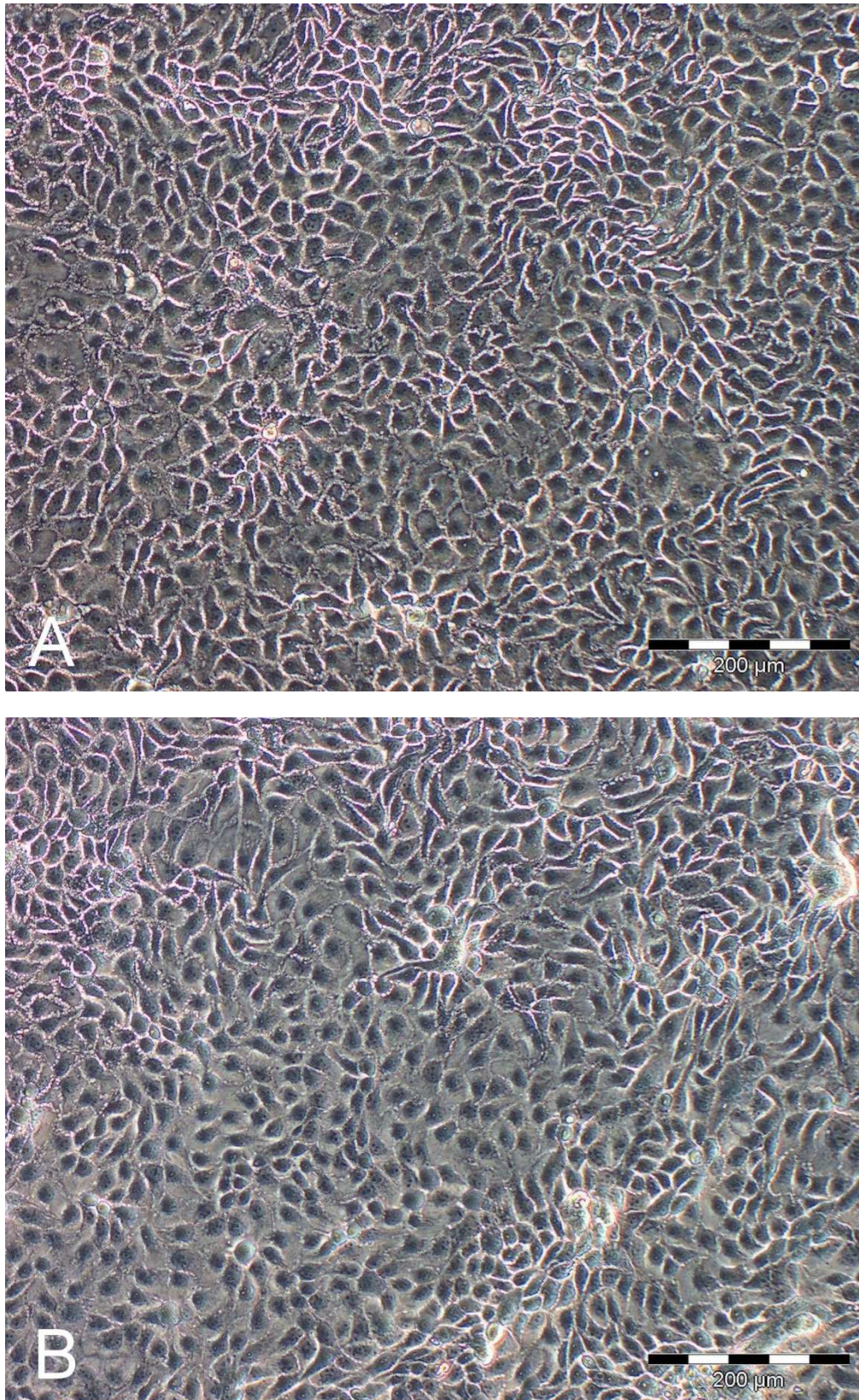


Abbildung 4.1: HCE-T-Zellen als konfluenter Monolayer in Sasaki-Medium (A) mit und (B) ohne Cholera toxin, lichtmikroskopische Aufnahmen mit Phasenkontrast; Balkenlänge entspricht 200 µm.



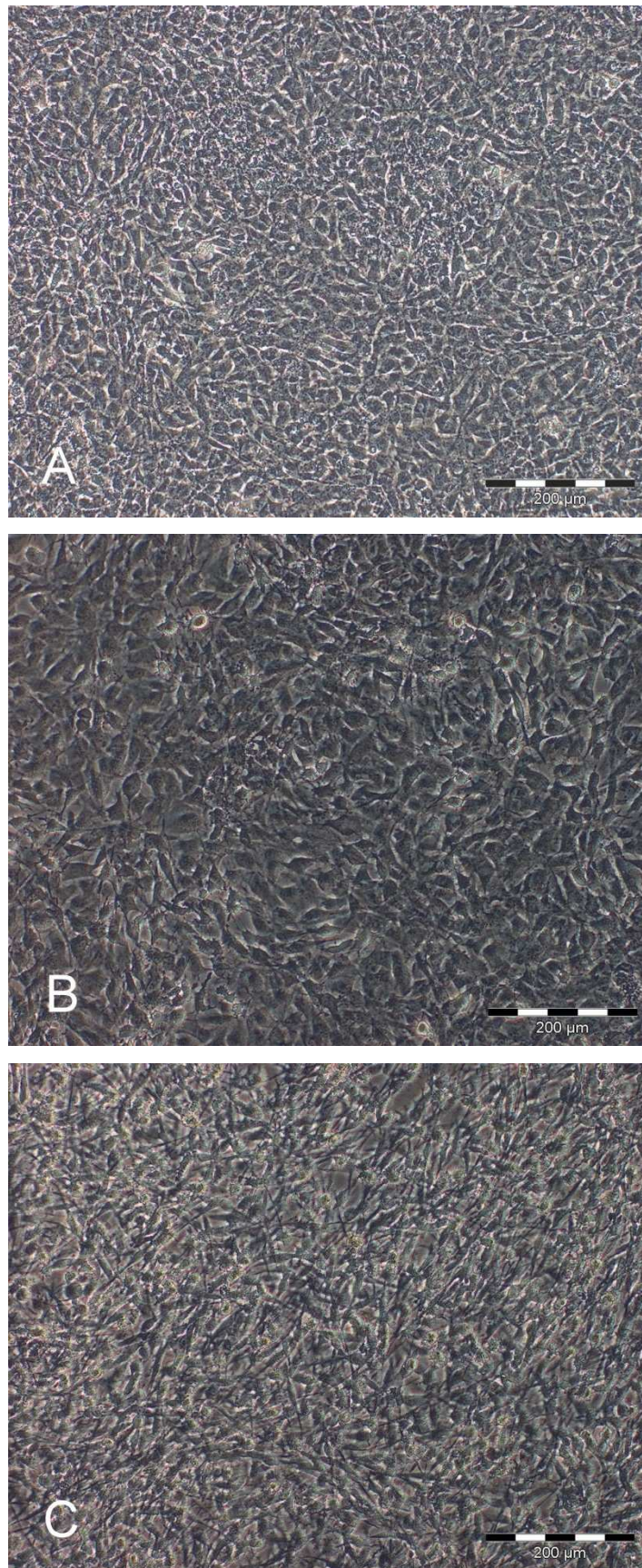


Abbildung 4.2: HCK-Zellen als konfluenter Monolayer in (A) F99, (B) F99 mit den Supplementen EGF und Insulin und (C) in dem DMSO-haltigen Sasaki-Medium (ohne Cholera toxin), lichtmikroskopische Aufnahmen mit Phasenkontrast; Balkenlänge entspricht 200 µm.

an das Sasaki-Medium zu einer Wachstumshemmung und der Ausbildung von einer eher spindelartigen Morphologie mit langen Zellfortsätzen (Abbildung 4.2). Da sich das Medium F99 und das Sasaki-Medium jeweils aus einer Mischung zweier Basalmedien zusammensetzen und gleichermaßen einen Serumanteil von 5% enthalten, lassen sich dieses veränderte Erscheinungsbild sowie das unterschiedliche Wachstumsverhalten höchstwahrscheinlich auf das Supplement DMSO im Sasaki-Medium zurückführen. Folglich wurden die HCK-Zellen für den Aufbau der HCC DMSO-frei im Medium F99 mit dem Zusatz von EGF und Insulin kultiviert.

#### **4.1.1.3 Immortalisierte humane corneale Endothelzellen – HENC**

Bei den HENC-Zellen handelte es sich ebenfalls um eine immortalisierte Zelllinie, die sich durch eine hohe Proliferationsrate sowie eine hohe Sättigungsdichte auszeichnete und die dadurch im konfluenten Zustand zu einem dichten Zellrasen auswuchs. Das Erscheinungsbild der hexagonalen bis polygonalen Zellen zeigte eine in-vivo-ähnliche Morphologie. In Analogie zu der Beobachtung bei den HCK-Zellen führte der Zusatz von EGF und Insulin zum Standardkultivierungsmedium F99 zu keiner merklichen Veränderung der Proliferationsrate und der Zellmorphologie, während die Adaption an das DMSO-haltige Sasaki-Medium erkennbar eine verminderte Proliferation und ein verändertes Erscheinungsbild der Zellen mit spitzen Zellfortsätzen verursachte (Abbildung 4.3). Deshalb wurden die HENC-Zellen, ebenso wie die HCK-Zellen, für den Aufbau der HCC DMSO-frei im Medium F99 mit dem Zusatz von EGF und Insulin kultiviert.

#### **4.1.1.4 Zusammenfassende Diskussion zur Kultivierung der humanen cornealen Zellen**

Als Vorbereitung der Kulturen für den Aufbau des HCC wurde versucht, die Kultivierungsmedien der epithelialen, stromalen und endothelialen Zellen aufeinander



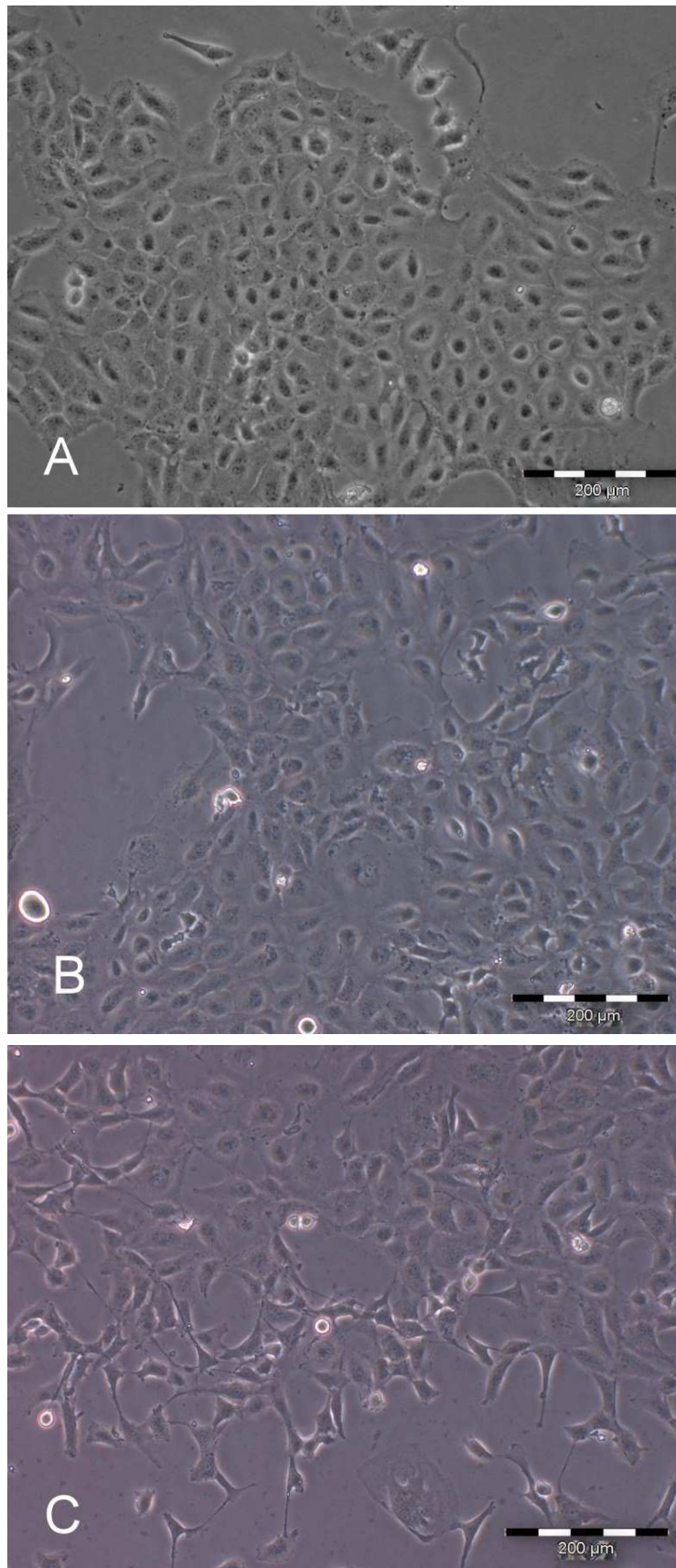


Abbildung 4.3: HENC-Zellen als subkonfluenten Monolayer in (A) F99, (B) F99 mit den Supplementen EGF und Insulin und (C) in dem DMSO-haltigen Sasaki-Medium (ohne Cholera-toxin), lichtmikroskopische Aufnahmen mit Phasenkontrast; Balkenlänge entspricht 200 µm.

abzustimmen. Das Standardmedium der endothelialen HENC-Zellen und der stromalen HCK-Zellen setzte sich aus einer 1:1-Mischung der beiden Basalmedium Ham's F12 und Medium 199 sowie einem 5%igen Zusatz von Serum zusammen. Das für die Kultivierung der epithelialen HCE-T-Zellen verwendete Sasaki-Medium hatte demgegenüber eine komplexere Zusammensetzung. Der 1:1-Mischung der Basalmedium Ham's F12 und DMEM wurden neben 5% Serum weitere Supplemente zugeführt, die das Wachstum und die Differenzierung der epithelialen Zellen fördern. Der Zusatz von DMSO zum Kultivierungsmedium führt zur Induktion der Differenzierung und ist in der Lage, die Ausbildung der epithelialen Barriereigenschaften cornealer Epithelzellen zu unterstützen [Santos et al., 2003; Hahne und Reichl, 2011]. Insofern ist das Supplement DMSO für die Kultivierung eines Cornea-Konstruktes für In-vitro-Arzneistoffabsorptionsuntersuchungen vorteilhaft. Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) stimuliert in Epithelzellen die Zellproliferation und Zellmigration sowie die Synthese von DNA und Fibronektin [Schultz et al., 1992a; Schultz et al., 1994; Wilson et al., 1994]. Wie in zahlreichen anderen Geweben vermittelt Insulin vermutlich metabolische und mitogene Effekte in cornealen Epithelzellen über Insulinrezeptoren [Rocha et al., 2002]. Yanai et al. konnten zeigen, dass die Supplemente EGF und Insulin auch in der immortalisierten HCE-T-Zelllinie eine Erhöhung der Zellproliferation bewirken und darüber hinaus eine anti-apoptotische Wirkung vermitteln [2006].

Der Versuch, die drei cornealen Zelltypen in Sasaki-Medium zu kultivieren, war nicht erfolgreich. Trotz des Verzichts auf Cholera toxin führte die Kultivierung der HCK- und HENC-Zellen in diesem Medium zu einer Wachstumshemmung und induzierte eine veränderte Zellmorphologie. Dieser Befund legt nahe, dass die im Vorfeld dieser Arbeit beschriebene beeinträchtigte Kontraktion der Stromabiomatrix des HCC durch den Wechsel auf Sasaki-Medium während der mehrwöchigen Kultivierung nicht allein durch das im Medium enthaltene Cholera toxin, sondern auch durch das Supplement DMSO verursacht wurde [Döhning, 2009].

Demgegenüber wurde der Zusatz der physiologischen Wachstumsfaktoren EGF und Insulin von den stromalen und endothelialen Zellkulturen gut vertragen, was durch verschiedene Literaturstellen bestätigt werden kann. So werden EGF- und auch Insulin-Rezeptoren sowohl in epithelialen als auch in stromalen und endothelialen Zellen der Cornea exprimiert [Schultz et al., 1994; Naeser, 1997]. EGF bewirkt auch in stromalen Zellen eine Stimulation der DNA-Synthese und fördert die Migration in allen drei cornealen Zelltypen [Schultz et al., 1992a; Grant et al., 1992]. Darüber hinaus konnten Untersuchungen zeigen, dass EGF die Kontraktion der Collagengelmatrix durch die inkorporierten stromalen Zellen bei In-vitro-Modellen unterstützt [Assouline et al., 1992]. Auch Insulin entfaltet eine proliferative Wirkung in cornealen stromalen Zellen und hat darüber hinaus eine anti-apoptotische Wirkung [Musselmann et al., 2005; Yanai et al., 2002]. In Kulturen von cornealen Endothelzellen stimuliert EGF ebenso wie Insulin die Mitose und die DNA-Synthese [Gospodarowicz et al., 1977; Schultz et al., 1992b; Woost et al., 1992a, b].

Deshalb wurden die HCK- und HENC-Zellen für den Aufbau des HCC im mit Insulin und EGF supplementierten Medium F99 kultiviert. So erfolgte während der Kultivierung des HCC bei Aufsaat der Epithelzellen auf das Stromabioäquivalent ein möglichst milder Wechsel auf das Medium der Epithelzellen.

#### **4.1.2      Aufbau des Cornea-Konstruktes**

Der schrittweise Aufbau eines organotypischen Corneaäquivalentes für die In-vitro-Testung der cornealen Arzneistoffabsorption wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben. Dabei handelt es sich um Modelle basierend auf bovinen, porcinen oder humanen cornealen Zellen [Tegtmeyer et al., 2004; Reichl und Müller-Goymann, 2003; Reichl et al., 2004]. Die Kultivierung erfolgt in Transwell-Membran-Einsätzen, die sowohl eine submerse als auch eine Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze erlauben. Vor Einsaat der Endothelzellen wird ein dünnes zellfreies Gel aus Collagen Typ I auf die Kultureinsätze aufgebracht, das das Anheften der Endothelzellen fördert und ein gutes Wachstumssubstrat darstellt. Nachdem die Endothelzellen einen konfluenten Monolayer ausgebildet haben, erfolgt das Aufbringen

der stromalen Zellen eingebettet in eine gerade gelierende Biomatrix aus Collagen Typ I, das sich als geeignetes Substrat für den Aufbau dreidimensionaler cornealer Gewebeäquivalente erwiesen hat [Minami et al., 1993; Zieske et al., 1994; Germain et al., 1999; Orwin und Hubel, 2000]. Während der weiteren submersen Kultivierung erfolgt durch die Aktivität der stromalen Zellen eine Kontraktion der Collagen-Biomatrix, die zu einer gewünschten Erhöhung der Festigkeit des Konstruktes führt. Die Ausprägung der Kontraktion wird dabei von der Zellzahl und der Collagenkonzentration beeinflusst, wobei eine hohe Zellzahl und eine niedrige Collagenkonzentration die Kontraktion unterstützen [Bell et al., 1979; Nishida et al., 1988]. Die Kontraktion der Stromabiomatrix ist bereits einen Tag nach dem Ablösen der Gele von der Wand des Kultivierungsgefäßes erkennbar und zeigt nach etwa 4 Tagen ihre stärkste Ausprägung. Das azelluläre Bodengel des Konstruktes unterliegt dabei keiner Kontraktion. Abschließend werden die Epithelzellen auf das Konstrukt aufgebracht, die auf der Collagenmatrix ebenfalls gute Anheftung und Proliferation zeigen. Nachdem die Epithelzellschicht ein konfluentes Stadium erreicht hat, ist es erforderlich, das Gewebeäquivalent an die Luft-Medium-Grenze anzuheben. Dadurch erfolgt die Nährstoffversorgung des Konstruktes ausschließlich durch Diffusion aus dem unteren Kompartiment des Transwells. Gleichzeitig befindet sich das Konstrukt entsprechend den Bedingungen in vivo in Kontakt mit der Luftumgebung, wodurch die Ausbildung eines mehrschichtigen, dichten Epithels gefördert wird [Minami et al., 1993; Chang et al., 2000; Ban et al., 2003; Hahne und Reichl, 2011].

Diese etablierte Methode stellte die Grundlage für die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen dar. Das Kultivierungsprotokoll wurde zunächst auf die Verwendung der immortalisierten HCK-Zelllinie anstelle der primären Fibroblasten angepasst. Anschließend erfolgte eine Variation des Konstruktaufbaus, die die Kultivierungsdauer des Konstruktes verkürzte und auf ein azelluläres, nicht kontrahierendes Collagengel als Substrat für die Endothelzellen verzichten konnte. Schließlich wurde das so erhaltene neue Kultivierungsprotokoll auf die Herstellung der HCC in 12er-Transwell-Platten übertragen, um als Vorbereitung für die unter 4.1.3 beschriebenen Untersuchungen an



Stromabioäquivalenten eine höhere Probenanzahl bei gleichem Materialeinsatz zu generieren.

#### **4.1.2.1 Konstruktaufbau unter Verwendung der HCK-Zelllinie**

Die Anwendung des ursprünglichen Kultivierungsprotokolls auf die HCK-Zellen zeigte, dass hier die Einsaat von 50.000 stromalen Zellen nicht zu einer ausreichenden Verfestigung der Biomatrix des HCC führte. Die Kontraktion blieb deutlich hinter der zuvor von Döhring für humane corneale Fibroblasten beschriebenen zurück [2009]. Döhring ermittelte am Ende des Kultivierungsprozesses des HCC bei der Epithelisierung mit CEPI-Zellen einen mittleren Durchmesser der HCC von  $7,8 \text{ mm} \pm 1,4 \text{ mm}$ . Bei Aufsaat von HCE-T-Zellen als Epithelzellen ergab sich bei Verwendung des choleratoxinhaltigen Sasaki-Mediums ein mittlerer Durchmesser von  $11,3 \text{ mm} \pm 1,5 \text{ mm}$ , wobei die Verwendung des Zellkulturmediums der CEPI-Zellen die Kontraktion förderte und in einem mittleren Durchmesser von  $9,7 \text{ mm} \pm 1,1 \text{ mm}$  resultierte. In dieser vorangehenden Arbeit wurde ebenfalls festgestellt, dass bei der Verwendung der HCE-T-Zellen durch den Wechsel auf das Sasaki-Medium am Kultivierungstag 12 der HCC die Kontraktion der Gelmatrix stagnierte.

Im Vergleich dazu hatten bei Verwendung der HCK-Zellen, kultiviert im Medium F99, in dieser ursprünglichen Zelleinsaat von 50.000 Zellen die Stromabioäquivalente nach zwölfzügiger Kultivierung einen mittleren Durchmesser von  $12,3 \text{ mm} \pm 0,6 \text{ mm}$  ( $n=3$ ). Eine Verdopplung der Zelleinsaat auf 100.000 Zellen ergab unter den gleichen Bedingungen einen mittleren Durchmesser von  $11,3 \text{ mm} \pm 0,6 \text{ mm}$  ( $n=3$ ). Eine erneute Verdopplung der Zellzahl auf 200.000 resultierte nach 12 Kultivierungstagen in einem mittleren Durchmesser von  $10,0 \text{ mm} \pm 0,0 \text{ mm}$  ( $n=3$ ). Da durch eine weitere Erhöhung der Zellzahl auf 300.000 keine wesentliche Verbesserung der Kontraktion (mittlerer Durchmesser  $9,7 \text{ mm} \pm 0,6 \text{ mm}$ ,  $n=3$ ) erzielt werden konnte, wurde schließlich für die Kultivierung der HCC mit HCK-Zellen eine Zelleinsaat von 250.000 Zellen gewählt. Dabei ergab sich ein mittlerer Durchmesser von  $9,8 \text{ mm} \pm 0,4 \text{ mm}$  ( $n=6$ ).

Bei einer vergleichenden Untersuchung mit in Sasaki-Medium kultivierten HCK-Zellen ergab sich bei dieser Zelleinsaat ein mittlerer Durchmesser der Stromabioäquivalente von  $12,3 \text{ mm} \pm 1,2 \text{ mm}$ , der sich bis zum Ende der Kultivierungsdauer des Konstruktes nicht weiter verminderte. Diese Beobachtung bestätigt den Befund des gehemmten Wachstums der HCK-Zellen in dem Epithelzellmedium und stimmt mit der von Döhring für primäre corneale Fibroblasten beschriebenen Beobachtung überein [2009]. Da in den hier vorliegenden Untersuchungen gänzlich auf das Supplement Choleratoxin verzichtet wurde, wird deutlich, dass auch der Zusatz von DMSO im Sasaki-Medium zu einer verminderten Kontraktion des Stromabioäquivalentes beitrug.

### **4.1.2.2 Variation des Konstruktaufbaus**

Diese Studie verfolgte das Ziel, die Festigkeit des stromalen Anteils des HCC zu erhöhen, der die wesentliche Biomatrix des HCC darstellt und als Anheftungssubstrat für die endothelialen und epithelialen Zellen dient. Durch die Untersuchungen von Döhring und die unter 4.1.1.2 beschriebenen Versuche der Medienadaption wurde deutlich, dass das für die Ausbildung der epithelialen Barriere notwendige Sasaki-Medium zu einer Beeinträchtigung stromaler Zellen führte hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die sie umgebende Collagenmatrix zu verdichten, und es die Zellen trotz Eliminierung des Supplements Choleratoxin in ihrem Wachstum hemmte [2009]. Da das ursprüngliche Kultivierungsprotokoll nach Aufbringen der stromalen Schicht bereits nach 4 Tagen die Aufsaat der Epithelzellen und damit den Wechsel auf das Sasaki-Medium vorsah, wurde eine Variation des Herstellungsprozesses der HCC vorgenommen, die mehr Zeit für die Kontraktion der Stromabiomatrix einräumte. Bei dieser Variation wurde mit dem Aufbau der Stromabiomatrix begonnen. Nach Erstarren der Collagengelmatrix erfolgte am selben Tag die Aufsaat der Endothelzellen auf das zu diesem Zeitpunkt noch nicht kontrahierte Stromabioäquivalent, sodass auf die Verwendung eines azellulären Bodengels, das nicht zu einer Verfestigung des gesamten HCC beiträgt, verzichtet werden konnte. Am Folgetag wurde ebenfalls die Kontraktion der Stromabiomatrix erleichtert, indem es mit Hilfe eines Spatels von der Wand des Transwell-Einsatzes gelöst

wurde. Wie im etablierten Kultivierungsprotokoll wurde den Endothelzellen eine Wachstumsperiode von einer Woche eingeräumt, um Konfluenz zu erreichen, bevor mit dem Aufbau des Konstruktes fortgefahren wurde. Gleichzeitig konnte sich in diesen 7 Tagen die Stromabiomatrix kontrahieren, ohne einem hemmenden Einfluss durch das Sasaki-Medium ausgesetzt zu sein. Bei dieser Variation des Kultivierungsprotokolls war es dann erforderlich, das Stroma-Endothel-Äquivalent zu wenden, um die Endothelschicht auf die Unterseite zu verlagern. Im Anschluss erfolgte die Aufsaat der Epithelzellen verbunden mit dem Wechsel des Kultivierungsmediums. Wie zuvor auch, schloss sich dann zunächst für die Ausbildung einer konfluenten Epithelzellschicht eine submerse Kultivierung für weitere 7 Tage an, bevor durch eine 10-tägige Kultivierung an der Luft-Medium-Grenze die Differenzierung eines mehrschichtigen Epithels gefördert wurde. Wie der Vergleich der Abbildungen 4.4 und 4.5 zeigt, lieferten beide Kultivierungsprotokolle sehr ähnliche histologische Ergebnisse. Der Vorteil dieser Variation des Konstruktaufbaus liegt, neben der um 3 Tage verlängerten, ungestörten Kontraktionszeit für die Stromabiomatrix, in einer um 4 Tage verkürzten Gesamtkultivierungsdauer. Außerdem eröffnet sie die Möglichkeit, das Stroma zunächst allein zu kultivieren, um es verfestigenden Modifikationen zu unterziehen, bevor mit der Aufsaat der Endothelzellen fortgefahren wird, um diese vor evtl. schädigenden Einflüssen zu schützen.

### **4.1.2.3 Miniaturisierung der HCC**

Nach erfolgreicher Implementierung des variierten Kultivierungsprotokolls wurde eine Miniaturisierung der HCC vorgenommen, wie sie schon von Weber für organotypische Haut-Konstrukte beschrieben wurde [2009]. Dabei wurde die Variation des Konstruktaufbaus auf die Verwendung von 12er- anstelle der sonst verwendeten 6er-Transwell-Platten übertragen. Diese Miniaturisierung ermöglicht einen höheren Probendurchsatz, der insbesondere bei zellulären Assays zur In-vitro-Toxizität sinnvoll ist, bei denen das schädigende Agens oftmals in verschieden hohen Konzentrationen oder unterschiedlichen Expositionsdauern getestet

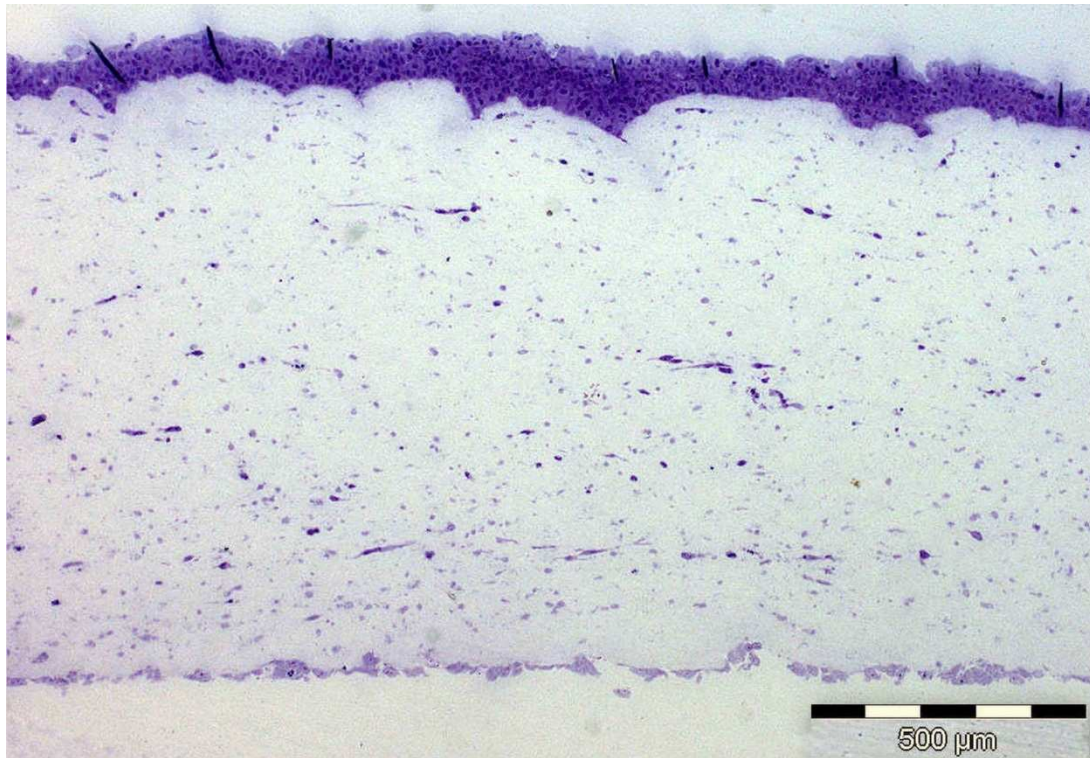


Abbildung 4.4: Querschnitt durch das humane Cornea-Konstrukt aufgebaut nach dem etablierten Kultivierungsprotokoll; Toluidinblau-Methylenblau-Färbung, Balkenlänge entspricht 500 µm.

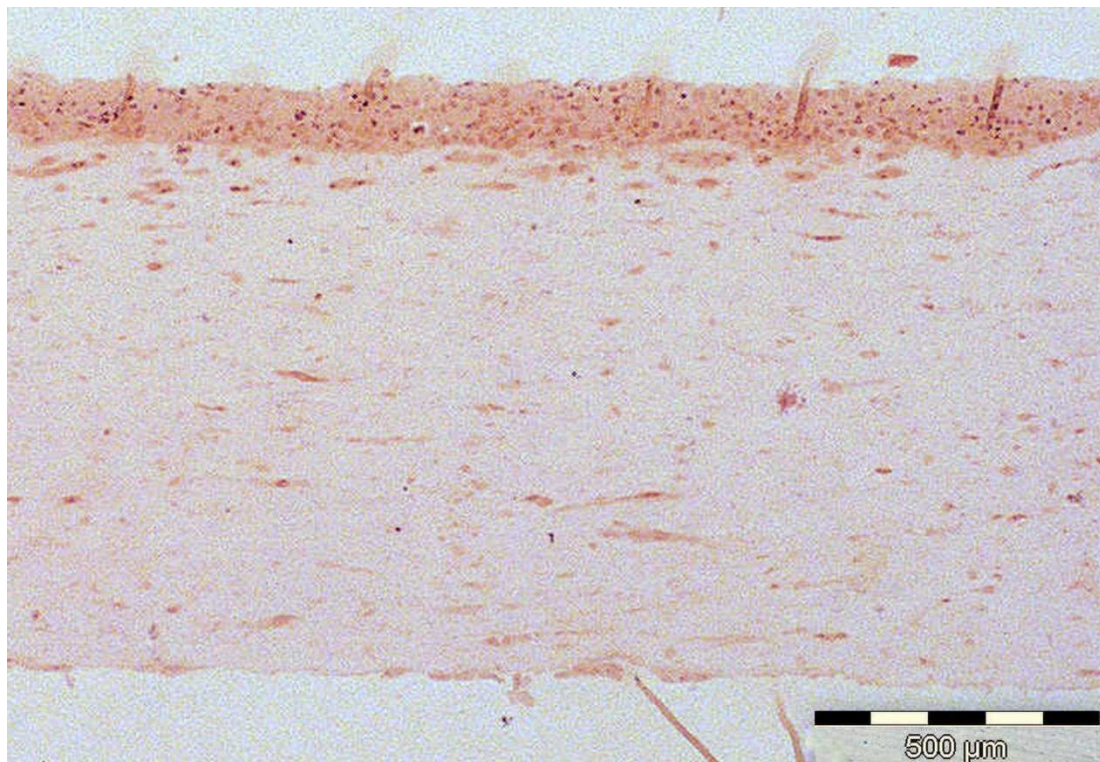


Abbildung 4.5: Querschnitt durch das humane Cornea-Konstrukt aufgebaut nach dem variierten Kultivierungsprotokoll; H&E-Färbung, Balkenlänge entspricht 500 µm.



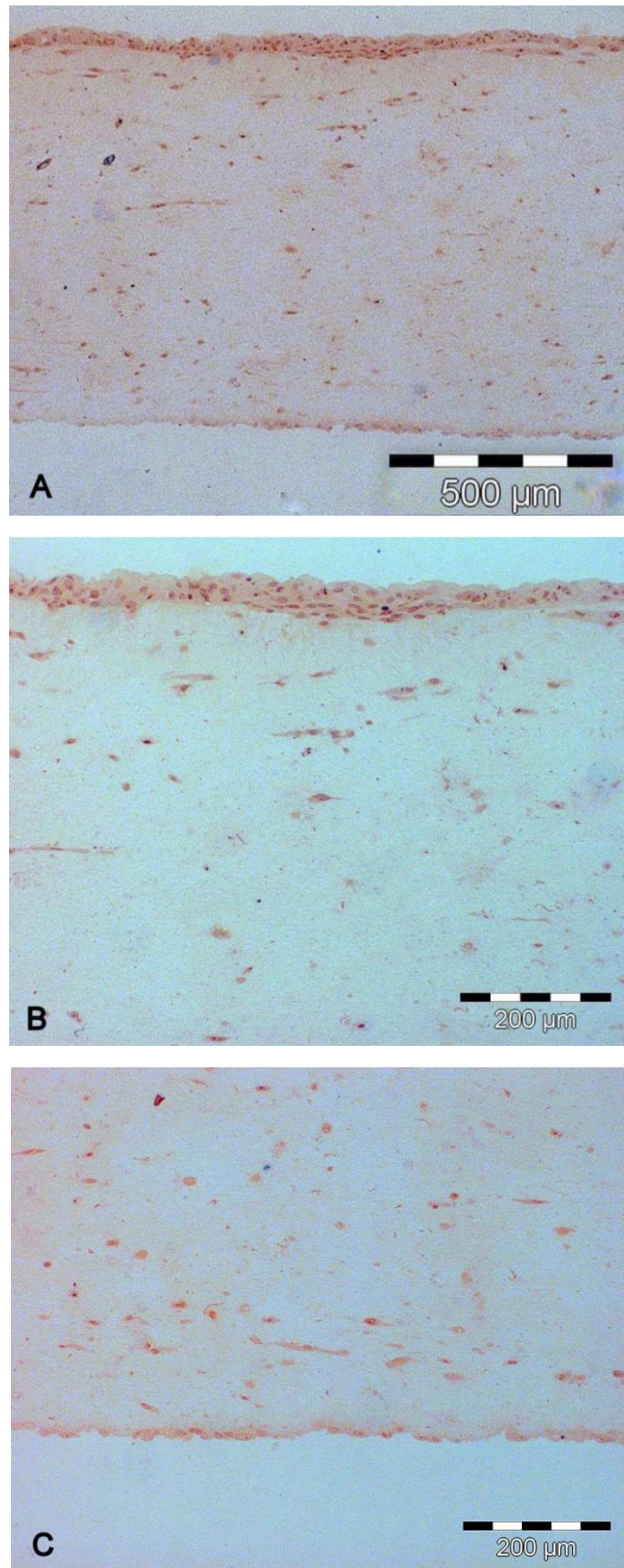


Abbildung 4.6: (A) Querschnitt durch ein miniaturisiertes humanes Cornea-Konstrukt; H&E-Färbung, Balkenlänge 500 µm. Vergrößerungen der Epithel- bzw. Endothelzellschicht sind in den Teilabbildungen (B) und (C) dargestellt; Balkenlänge 200 µm.

wird. Die histologische Charakterisierung der mHCC (Abbildung 4.6) zeigte, dass auch hier eine der In-vivo-Situation vergleichbare Morphologie erreicht werden konnte.

#### **4.1.2.4 Zusammenfassende Diskussion zum Aufbau des Cornea-Konstruktes**

Der in dieser Studie vorgenommene Austausch der primären humanen Fibroblasten durch die immortalisierte HCK-Zelllinie für den Aufbau der Stromabioäquivalente führte alsbald zu der Erkenntnis, dass die Fähigkeit der HCK-Zelllinie, eine Kontraktion der sie umgebenden Collagenmatrix herbeizuführen und damit diese zu verdichten und ihre Festigkeit zu erhöhen, deutlich geringer ausgeprägt ist. Dennoch erwies sich die Kontraktion des Gelgerüsts durch die HCK-Zellen, wie auch für primäre Zellen beschrieben, als abhängig von der in dieser Matrix inkorporierten Zellzahl [Bell et al., 1979]. Erst durch ein Verhundertfachen der Zelleinsaat im Vergleich zu den primären Fibroblasten konnte eine vergleichbare Kontraktion des Stromabioäquivalentes erreicht werden. Dieser Befund könnte entweder auf den immortalisierten Status der HCK-Zellen, der eher eine Proliferation als eine Differenzierung fördert, oder aber auf die erfolgreiche Konservierung der Eigenschaften des Keratozyten-Phänotyps bei der Initiierung dieser Zelllinie zurückgeführt werden. Unter serumfreien Kultivierungsbedingungen, die den Keratozyten-Phänotyp erhalten, unterbleibt eine Kontraktion der collagenösen Matrix [Manzer et al., 2009]. Insofern sind die Ergebnisse der verminderten Kontraktionseigenschaften dieser stromalen Zellen eher in Hinblick auf ihren Keratozyten-ähnlichen Phänotyp zu interpretieren.

Der Aufbau des HCC nach dem variierten Kultivierungsprotokoll, sowohl in dem ursprünglichen Format als auch in der miniaturisierten Ausführung, führte ebenso wie die Verwendung der bereits von Reichl et al. etablierten Kultivierungsmethode zu einer sehr guten Annäherung an den in vivo vorliegenden histologischen Aufbau der Cornea [2004]. In beiden Fällen ist ein mehrschichtiges Epithel zu erkennen, das allerdings im Vergleich zum humanen Originalgewebe eine unregelmäßigere Oberfläche aufweist. Diese Beobachtung ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die im Modell gegebenen Bedingungen die

physiologischen Vorgänge nicht vollständig simulieren, da in vivo der Tränenfilm gemeinsam mit dem Lidschlag für einen Abschilferungseffekt sorgt, der zu einer glatten, regelmäßigen Oberfläche der Cornea führt [Grehn, 2012]. Ein weiterer Unterschied zum Originalgewebe liegt darin, dass in den In-vitro-Modellen eine klare Strukturierung der Epithelzellen in Basal-, Flügel- und Oberflächenzellen unterbleibt. Diese fehlende Ausprägung ist vermutlich durch die Verwendung der immortalisierten HCE-T-Zelllinien bedingt. Zelllinien zeigen auf Grund der Einführung des SV40-Vektors einen sogenannten transformierten Phänotyp, der zwar eine nahezu unbegrenzte Anzahl von Zellteilungen durchlaufen kann und ein starkes Proliferationsverhalten zeigt, der allerdings oftmals auch ein geringeres Differenzierungspotential aufweist [Freshney, 2005]. Dennoch bilden die immortalisierten Epithelzellen eine adäquate Barriere aus und eignen sich deshalb sehr gut für den Aufbau von In-vitro-Modellen für die transcorneale Arzneistoffabsorption [Reichl et al., 2004; Reichl, 2008; Döhring, 2009]. Der Vorteil bei der Verwendung von immortalisierten Zellen anstelle von Primärzellen beim Aufbau von In-vitro-Modellen liegt eindeutig in der besseren Verfügbarkeit und der einfachen Kultivierbarkeit über einen langen Zeitraum bei gleichbleibenden proliferativen Eigenschaften. Die Abbildungen 4.4 und 4.5 zeigen außerdem für beide Methoden des Aufbaus des HCC die Ausbildung einer einreihigen Endothelzellschicht, die allerdings vermutlich durch den Einbettungsprozess partiell abgetragen wurde. Gleiches gilt auch für die in Abbildung 4.6 dargestellten mHCC.

### **4.1.3 Untersuchungen an Stromabioäquivalenten**

Nach erfolgreicher Anpassung des Kultivierungsprotokolls des humanen Cornea-Konstruktes an die Verwendung der immortalisierten HCK-Zelllinie sollte im Folgenden die Eignung der Riboflavin/UVA-Methode zur Einführung von Quervernetzungen in die Collagenmatrix des Stromabioäquivalentes untersucht werden mit dem Ziel, eine Verfestigung des Gelgerüsts herbeizuführen. Hierfür wurde das Modell ausgehend von den mHCC auf den stromalen Teil reduziert. Die Kultivierung erfolgte über eine Dauer von 7 Tagen und entsprach damit dem Zeitraum bei Aufbau des vollständigen Cornea-Konstruktes vor der Aussaat der Epithelzellen

und dem damit verbundenen Wechsel des Kultivierungsmediums, währenddessen das Stroma ungehindert kontrahieren konnte. Da für die siebentägige submerse Kultivierung kein Transwell-Membraneinsatz erforderlich war, wurden die Stromabioäquivalente in 24-Well-Zellkulturplatten aufgebaut. Die eine Woche alten Stromabioäquivalente hatten im voll hydratisierten Zustand einen Durchmesser von etwa 8 mm und eine Dicke von circa 1,5 mm. Bei lichtmikroskopischer Betrachtung sind zufällig angeordnete faserige Strukturen augenscheinlich. Hierbei handelt es sich vermutlich um Collagenfasern (Durchmesser ca. 1-12  $\mu\text{m}$ ), die sich zu Faserbündeln zusammengelagert haben, oder aber um verbleibende unlösliche Rückstände der Collagenextraktion aus den Rattenschwanzsehnen [Kunsch und Kunsch, 2005; Thews et al., 1999]. Auch die inkorporierten HCK-Zellen sind vereinzelt erkennbar (Abbildung 4.7). Diese Stromabioäquivalente wurden der unter 3.3.1.2.2 beschriebenen Riboflavin/UVA-Behandlung mit unterschiedlich hohen Bestrahlungsdosen unterzogen. Im Anschluss wurden die Auswirkungen dieser Exposition auf die Zellviabilität der inkorporierten HCK-Zellen, die viskoelastischen Eigenschaften der Gelmatrix und das Molekulargewicht der Collagenproteinfragmente untersucht.

### **4.1.3.1 Viabilitätsmessungen**

Die Untersuchung der Stoffwechselleistung der in der Gelmatrix inkorporierten HCK-Zellen mittels MTT-Assay zeigte, dass die Zellviabilität innerhalb der Stromabioäquivalente infolge der Riboflavin/UVA-Behandlung beträchtlich gemindert wurde. Bereits eine beidseitige Bestrahlung mit 1,0 J/cm<sup>2</sup> reduzierte die Zellviabilität nach 24 Stunden auf unter 50%. Ein zusätzlicher Bestrahlungszyklus von 1,0 J/cm<sup>2</sup> führte zu einer weiteren Abnahme auf unter 5% (Abbildung 4.8 A), obwohl diese Bestrahlungsdosis noch deutlich unter der in der Ophthalmologie zur Behandlung des Keratokonus eingesetzten Dosis von 5,4 J/cm<sup>2</sup> lag. Eine detailliertere Betrachtung des Bestrahlungsdosenbereichs von 0-2,0 J/cm<sup>2</sup>, bei der die beidseitige Bestrahlung in Zyklen von 0,25 J/cm<sup>2</sup> durchgeführt wurde, zeigte auch hier eine Abnahme der Zellviabilität auf unter 5%. Darüber hinaus ist deutlich eine Abhängigkeit der Zellviabilität von der Bestrahlungsdosis erkennbar (Abbildung 4.8 B). Die Werte bei einer



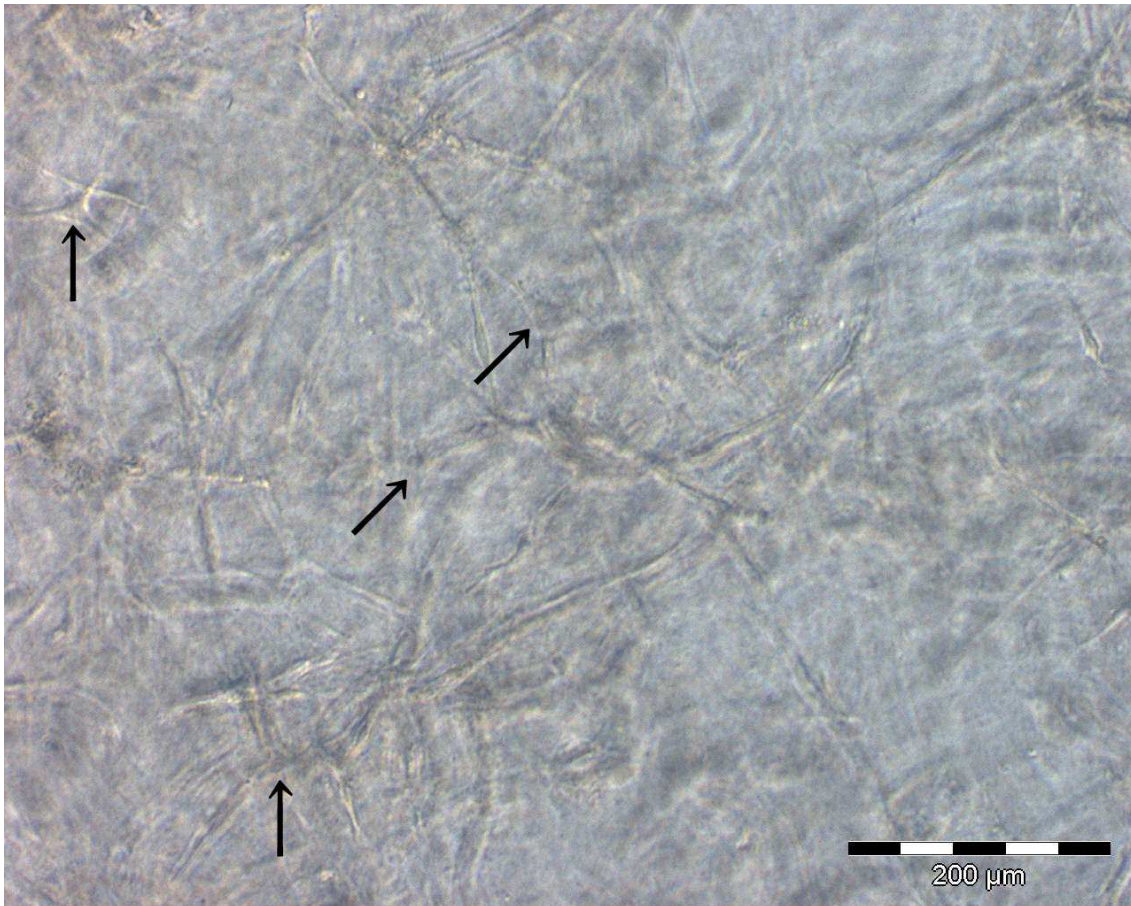


Abbildung 4.7: Lichtmikroskopische Aufnahme mit Phasenkontrast eines kontrahierten Stromabioäquivalentes nach siebentägiger Kultivierung. Die inkorporierten HCK-Zellen zeigten eine dendritische Morphologie (Pfeile); Balkenlänge 200  $\mu\text{m}$ .

Bestrahlungsdosis von  $0 \text{ J/cm}^2$  zeigen, dass die alleinige Inkubation mit dem riboflavinhaltigen Medium ohne eine Bestrahlung keinen schädigenden Effekt auf die Stromabioäquivalente ausübte, da hier die Zellviabilität im Mittel bei 97% lag. Da auch in der klinischen Anwendung eine Schädigung der Keratozyten auftritt, die aber nach einiger Zeit kompensiert werden kann, wurde außerdem untersucht, ob bei weiterer Kultivierung der Stromabioäquivalente nach der Riboflavin/UVA-Behandlung eine Regeneration der Zellviabilität erfolgt. Dafür wurde nach der beidseitigen Bestrahlung mit  $1,5 \text{ J/cm}^2$  die Zellviabilität der Stromabioäquivalente nach 1, 7, 14 und 21 Tagen mittels MTT-Assay analysiert. Die Abbildung 4.9 zeigt, dass die weitere Kultivierung über bis zu 3 Wochen nach der Traumatisierung zu keiner Regeneration der Zellviabilität der HCK-Zellen

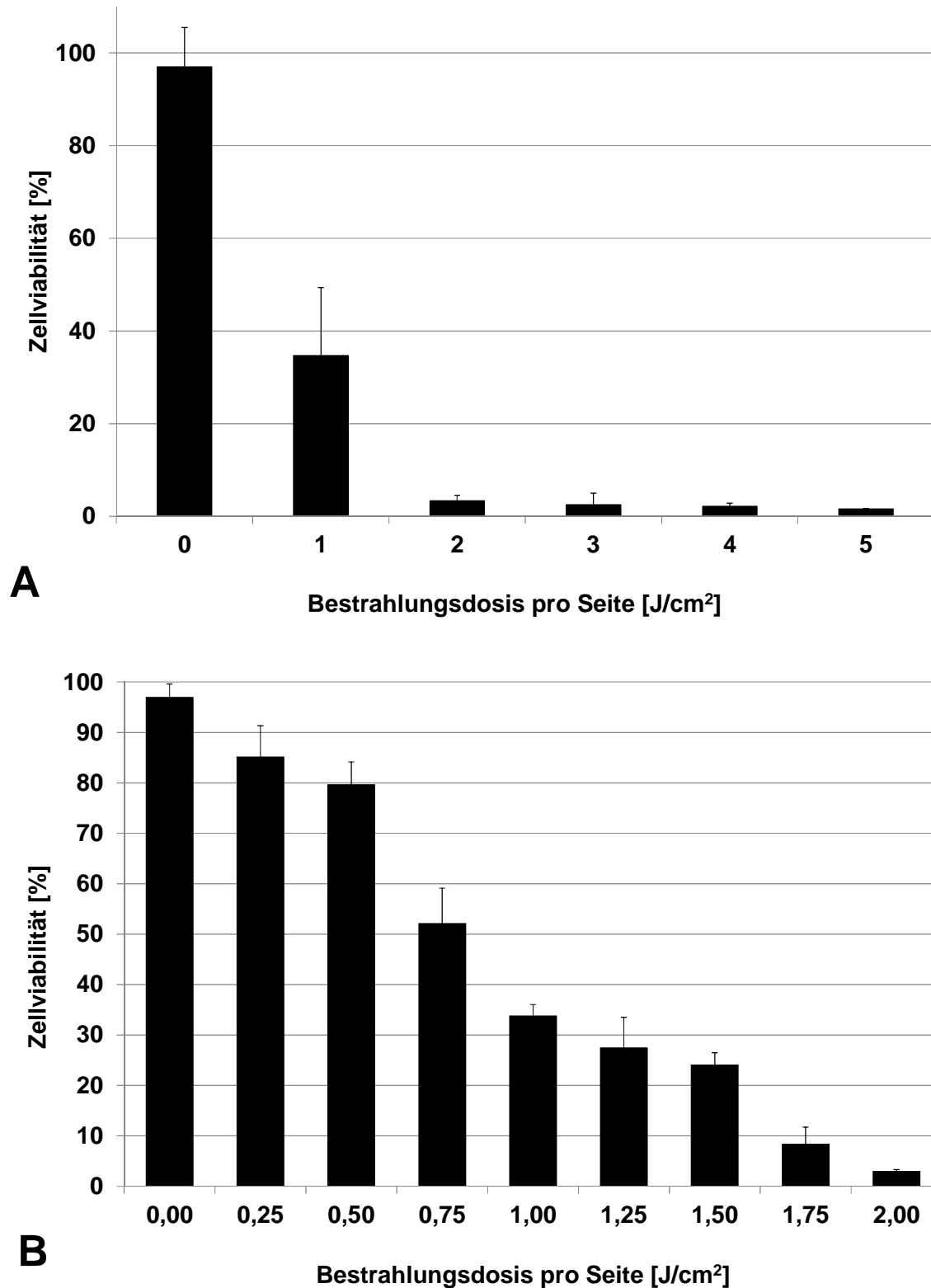


Abbildung 4.8: MTT-Assay der Stromabioäquivalente 24 Stunden nach der Bestrahlung; (A) Bestrahlungsdosis von 0-5,0 J/cm² ausgeführt in Zyklen von 1,0 J/cm² ( $\bar{x} \pm sd$ , n=5); (B) Bestrahlungsdosis von 0-2,0 J/cm² ausgeführt in Zyklen von 0,25 J/cm² ( $\bar{x} \pm sd$ , n=3-4). Als Referenz wurden unbehandelte Stromabioäquivalente verwendet, deren Zellviabilität als 100% festgelegt wurde.

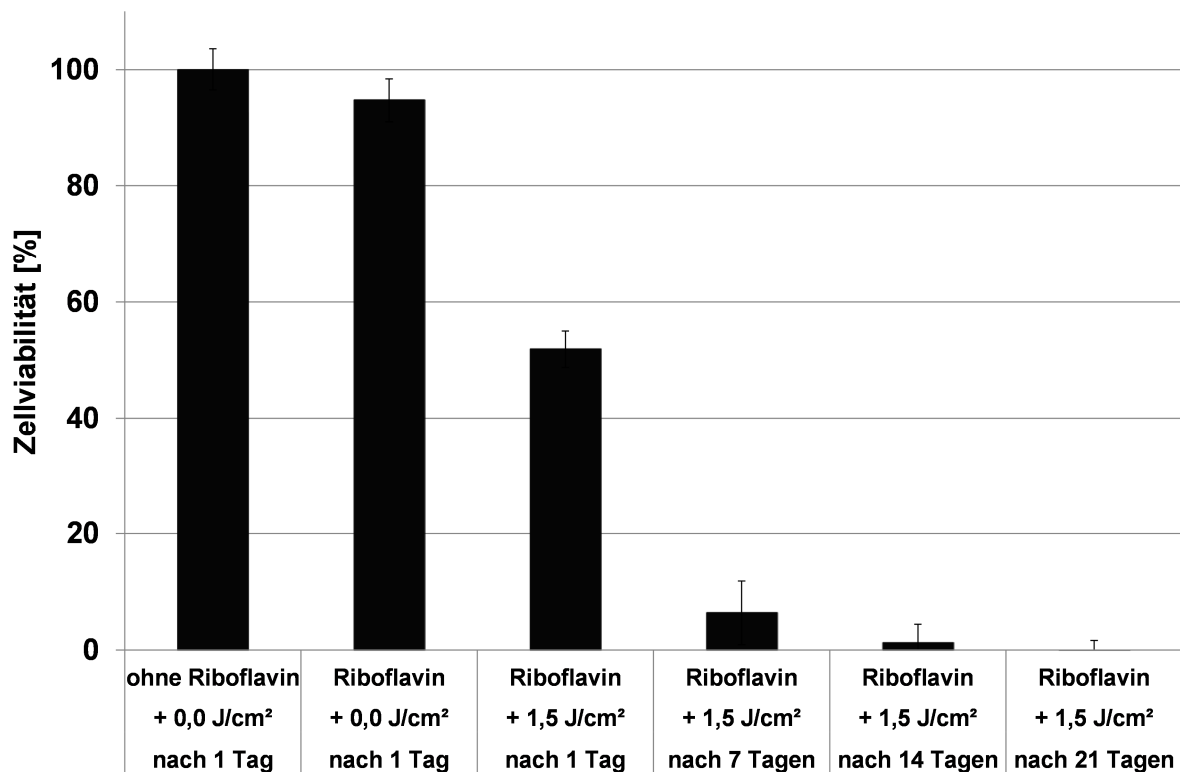


Abbildung 4.9: MTT-Assay der Stromabioäquivalente 1, 7, 14 und 21 Tage nach der beidseitigen Bestrahlung mit einer Dosis von 1,5 J/cm<sup>2</sup> ( $\bar{x} \pm sd$ , n=3). Als Referenz wurden unbehandelte Stromabioäquivalente verwendet, deren Zellviabilität an Tag 1 der Messreihe als 100% festgelegt wurde.

führte, sondern die Viabilität der Zellen weiter abnahm. Dieser Befund ist höchstwahrscheinlich auf den in dieser Studie gewählten Bestrahlungsvorgang mittels des Bio-Link BLX zurückzuführen. Dieser besitzt zwar den Vorteil, dass der Bestrahlungsvorgang ganzer Zellkulturplatten unter Beibehaltung der sterilen Kulturbedingungen durchgeführt werden kann, allerdings werden die Stromabioäquivalente stets vollständig der UVA-Bestrahlung ausgesetzt. Im Gegensatz dazu wird bei der klinisch angewendeten Methode eine UV-Diode eingesetzt, die nur den zentralen Bereich der Cornea kreisförmig mit einem Durchmesser von 7-8 mm bestrahlt, sodass in vivo über einen Zeitraum von bis zu 6 Monaten eine Regeneration des Gewebes über ein Einwachsen von Keratozyten aus dem

angrenzenden unbestrahlten Bereich des Stromas erfolgen kann [Wollensak et al., 2003a; Spörl et al., 2007, 2008].

#### 4.1.3.2 Rheologische Untersuchung

Der verfestigende Effekt der Riboflavin/UVA-Behandlung auf die Collagenmatrix der Stromabioäquivalente wurde mittels einer oszillationsrheologischen Untersuchung beurteilt, die es ermöglicht, die viskoelastischen Eigenschaften einer Probe zu bestimmen. Dazu wurden die bei dieser Messmethode üblichen Parameter komplexer Schubmodul  $G^*$ , Speichermodul  $G'$ , Verlustmodul  $G''$  und Phasenverschiebungswinkel  $\delta$  betrachtet. Die Deformation der zwischen zwei Messplatten befindlichen Probe erfolgt durch eine oszillierende Bewegung, die von der oberen Messplatte mit einer definierten sinusförmigen Schubspannung bei konstanter Frequenz ausgeführt wird. Durch die Messung im zuvor ermittelten linear-viskoelastischen Bereich erfolgt die Messung zerstörungsfrei unter Erhalt der inneren Probenstruktur, sodass die oszillationsrheologischen Kenngrößen konstant bleiben [Mezger, 2000].

Der Speichermodul  $G'$ , auch elastischer Modul genannt, ist ein Maß für die während des Scherprozesses in der Probe reversibel gespeicherte Deformationsenergie, die nach Entlastung der Probe vollständig für die Rückdeformation zur Verfügung steht. Damit gibt der Speichermodul das elastische Verhalten der Probe an. Demgegenüber ist der Verlustmodul  $G''$  ein Maß für die während des Verformungsprozesses verlorene Deformationsenergie, die zur Veränderung der Probenstruktur aufgewendet wurde, oder aber z.B. in Form von Wärme an die Umgebung abgegeben wurde. Demnach repräsentiert der Verlustmodul das viskose Verhalten der Probe und wird deshalb auch viskoser Modul genannt. Aus der vektoriellen Summe dieser beiden Messgrößen ergibt sich der komplexe Schubmodul  $G^*$  als resultierender Vektor, der das gesamte viskoelastische Verhalten der Probe widerspiegelt. Der Phasenverschiebungswinkel  $\delta$  errechnet sich als Tangens des Quotienten  $G''/G'$  und kann Werte zwischen  $0^\circ$  und  $90^\circ$  annehmen. Bei  $\delta=0^\circ$  liegt ein idealelastischer Festkörper vor, da keine Phasenverschiebung zwischen der sinusförmigen

Schubspannungs- und der resultierenden ebenfalls sinusförmigen Deformationskurve auftritt. Im Bereich zwischen  $0^\circ$  und  $90^\circ$  liegt viskoelastisches Fließverhalten vor, wobei eine Erhöhung des Phasenverschiebungswinkels einer stärkeren Ausprägung der viskosen Eigenschaften bzw. einem geringeren Anteil der elastischen Eigenschaften entspricht. Bei  $\delta=90^\circ$  liegt entsprechend eine idealviskose Flüssigkeit vor [Mezger, 2000].

Die oszillationsrheologische Untersuchung zeigte Veränderungen der viskoelastischen Eigenschaften der Stromabioäquivalente infolge der Riboflavin/UVA-Behandlung. In den behandelten Proben war eine statistisch signifikante Zunahme des komplexen Schubmoduls und des Speichermoduls gegenüber der unbehandelten Referenz feststellbar (Abbildung 4.10 A). Daraus ließ sich ableiten, dass die kombinierte Behandlung mit Riboflavin und UVA-Strahlung eine Zunahme der elastischen Komponente innerhalb der Stromabioäquivalente verursachte. Diese Zunahme war am deutlichsten ausgeprägt für die Bestrahlungsdosen von  $1 \text{ J/cm}^2$  und  $2 \text{ J/cm}^2$  pro Seite, während die weitere Erhöhung der Bestrahlungsdosis zu keiner weiteren merklichen Erhöhung der Festkörpereigenschaften führte. Der Verlustmodul, der die viskosen Anteile der Proben repräsentiert, war bereits in den unbehandelten Proben gering ausgeprägt und zeigte keine erkennbaren Veränderungen durch die Riboflavin/UVA-Behandlung. Auch der Phasenverschiebungswinkel, der das Verhältnis von viskosen zu elastischen Anteilen beschreibt, blieb unbeeinflusst im Größenbereich von etwa  $4^\circ$  (Abbildung 4.10 B). Dies ist sicherlich darauf zurückzuführen, dass bereits in den unbehandelten Proben der Speichermodul deutlich den Verlustmodul dominierte und eine weitere Erhöhung des Speichermoduls keine merkliche Veränderung des Verhältnisses der beiden Module bewirken konnte.

Insgesamt betrachtet ist eine Verbesserung der biomechanischen Eigenschaften der Stromabioäquivalente durch die Riboflavin/UVA-Behandlung messbar und auch statistisch signifikant. Dennoch ist der verfestigende Effekt gering ausgeprägt und erscheint deshalb als nicht ausreichend für das anvisierte Ziel, die Handhabung der HCC während der In-vitro-Permeationsuntersuchungen zu erleichtern.

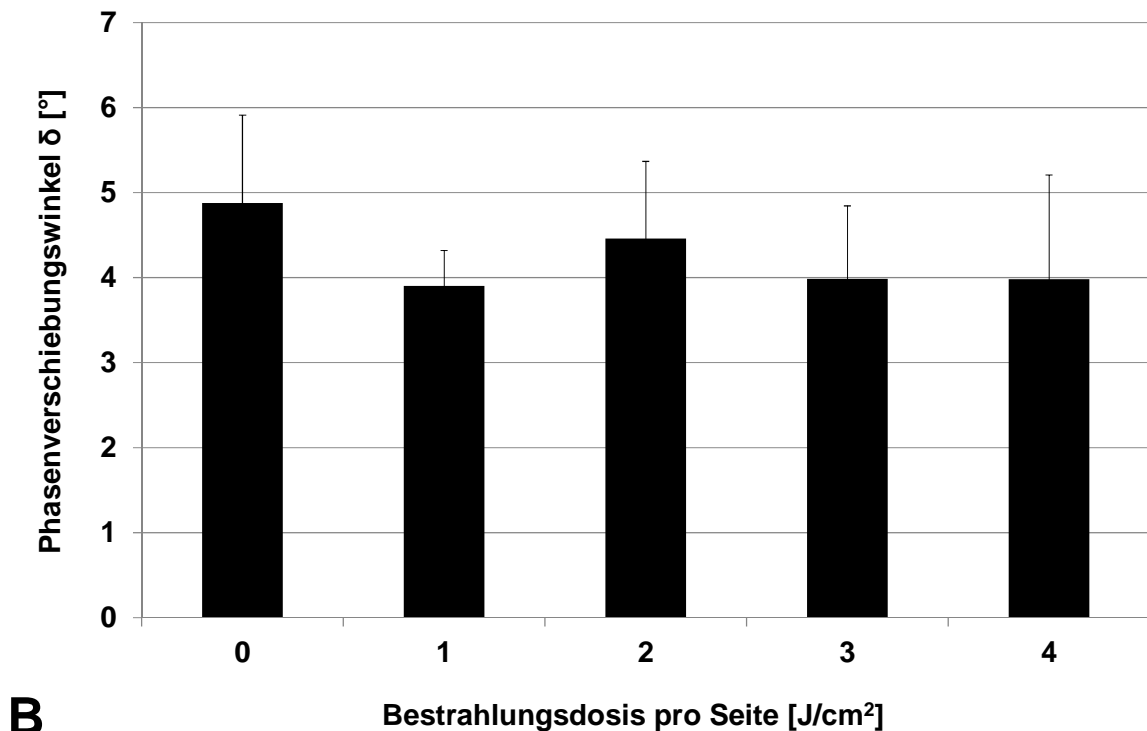
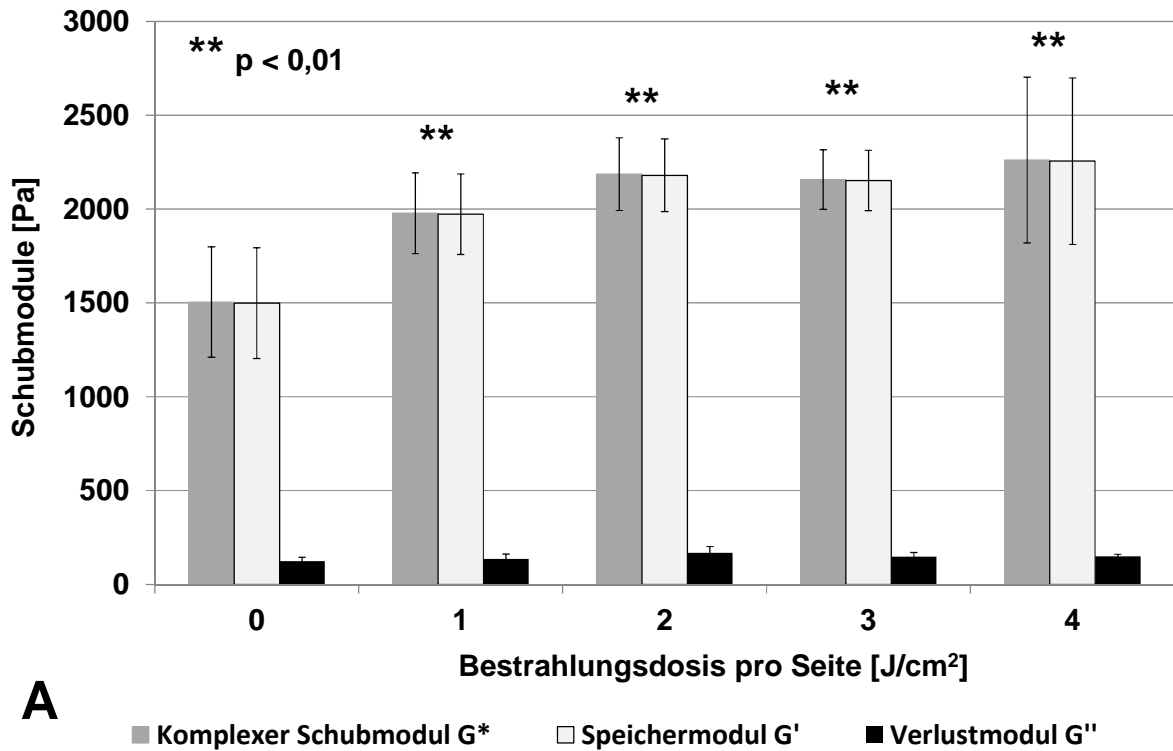


Abbildung 4.10: Oszillationsrheologische Untersuchung der Strombioäquivalente nach Riboflavin/UVA-Behandlung; (A) Darstellung des komplexen Schubmoduls, des Speichermoduls und des Verlustmoduls in Abhängigkeit von der applizierten Bestrahlungsdosis; (B) Phasenverschiebungswinkel aufgetragen über die Bestrahlungsdosis; ( $\bar{x} \pm sd$ ,  $n=5-8$ ).

#### 4.1.3.3 Gelelektrophoretische Untersuchung

Die gelelektrophoretische Untersuchung unter reduktiven Bedingungen ergab das für Collagen Typ I charakteristische Bandenmuster mit den beiden Monomerbanden  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  sowie den beiden Dimerbanden  $\beta 11$  und  $\beta 12$ , die sich je aus zwei Monomerbanden zusammensetzen (Abbildung 4.11). Das Ausbleiben der  $\gamma$ -Bande der trimeren Polypeptidkette, die bei einem Molekulargewicht von etwa 300 kDa zu erwarten wäre, kann auf die denaturierenden Bedingungen zurückgeführt werden, die eine Aufspaltung der Tripelhelix des Collagenmoleküls bewirken [Wollensak und Redl, 2008; Gunkel, 1994]. Collagen zeigt bei der SDS-PAGE die Besonderheit, dass es eine geringere elektrophoretische Mobilität aufweist als globuläre Proteine gleicher Molekülgröße. Obwohl die beiden  $\alpha$ -Ketten des Collagenmoleküls annähernd das gleiche Molekulargewicht von etwa 98 kDa aufweisen, erscheinen die beiden Ketten als scharf getrennte Banden bei einer höheren Molekülgröße [Lewis und Piez, 1964]. Dabei legt die  $\alpha 2$ -Kette eine größere Wanderungsstrecke im Gel zurück. Dementsprechend erscheint auch die  $\beta 12$ -Dimerbande bei einem niedrigeren Molekulargewicht als die  $\beta 11$ -Dimerbande. Zurückgeführt wird dieses atypische elektrophoretische Verhalten auf die spezielle Aminosäurezusammensetzung des Collagenmoleküls. Furthmayr und Timpl postulierten, dass der hohe Gehalt an Iminosäureresten, der eine gewisse Starrheit des Moleküls bedingt, hierfür verantwortlich sei [1971]. Spätere Untersuchungen legen nahe, dass der Grund hierfür eher in dem niedrigen Anteil hydrophober Aminosäurereste liegt, wodurch nur geringe Wechselwirkungen des Collagens mit dem Detergens SDS auftreten, die zu SDS-Collagen-Komplexen geringer Ladungsdichte führen [Hayashi und Nagai, 1980].

Anhand der Wanderungsstrecke des Molekülgrößenmarkers ergab sich für die  $\beta$ -Banden ein Molekulargewicht im Bereich von 260 kDa und für die  $\alpha$ -Monomerbanden von etwa 130-140 kDa. Weiterhin waren einige Banden geringerer Molekülgröße erkennbar, die vermutlich infolge der Hydrolyse der Proteine unter reduktiven Bedingungen auftraten. Darüber hinaus blieb ein Teil des Collagens der Stromabioäquivalente unlöslich und führte dadurch zu einer hochmolekularen Bande, die nicht in das Sammelgel einwandern konnte. Diese

Beobachtung konnte bei allen Proben gemacht werden, auch bei den unbehandelten und den mit Riboflavin inkubierten, unbestrahlten Proben. Diese hochmolekulare Bande nahm allerdings in ihrer Intensität bei den Proben zu, die zusätzlich der UVA-Bestrahlung ausgesetzt wurden. Außerdem war erkennbar, insbesondere bei den beiden höchsten Bestrahlungsdosen in den Bahnen F und G, dass mit zunehmender Bestrahlungsdosis die Intensität der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Banden sowie der niedermolekularen Banden abnahm. Daraus ließ sich ableiten, dass durch die Riboflavin/UVA-Behandlung eine Quervernetzung der Gelmatrix der Stromabioäquivalente stattgefunden hatte, die zu einer Erhöhung des Molekulargewichts des enthaltenen Collagens führte. Ein vergleichbares Ergebnis wurde bereits von Wollensak und Redl bei der Riboflavin/UVA-Behandlung von porcinen Corneae beschrieben [2008]. In dieser Studie wurde infolge der Behandlung eine zusätzliche intensive Bande im Sammelgel sichtbar, die sich als resistent gegen Mercaptoethanol, Hitze und Pepsin erwies und deren Molekulargewicht auf mindestens 1000 kDa geschätzt wurde.

#### **4.1.3.4 Zusammenfassende Diskussion zu Untersuchungen an Stromabioäquivalenten**

Die biomechanische Festigkeit von in vitro erzeugten Stromabioäquivalenten auf Collagengelbasis ist gering ausgeprägt [Ruberti und Zieske, 2008]. Deshalb wird für viele Fragestellungen eine Verfestigung der Biomatrix angestrebt. Die in dieser Studie eingesetzte Riboflavin/UVA-Methode zur Einführung von Quervernetzungen zwischen und innerhalb der Collagenmoleküle ist eine Methode, die kürzlich in der klinischen Behandlung des Keratokonus etabliert wurde [Wollensak et al., 2003a]. Der verfestigende Effekt konnte zuvor an Kaninchencorneae und an enukleierten porcinen Bulbi gezeigt werden [Spörl et al., 1997, 2000]. Ergänzend dazu konnte bei ex vivo durchgeführten Experimenten an porcinen und humanen Corneae infolge der Riboflavin/UVA-Behandlung eine Erhöhung des Elastizitätsmoduls um den Faktor 1,8 für das tierische bzw. 4,5 für das menschliche Gewebe ermittelt werden [Wollensak et al., 2003d].



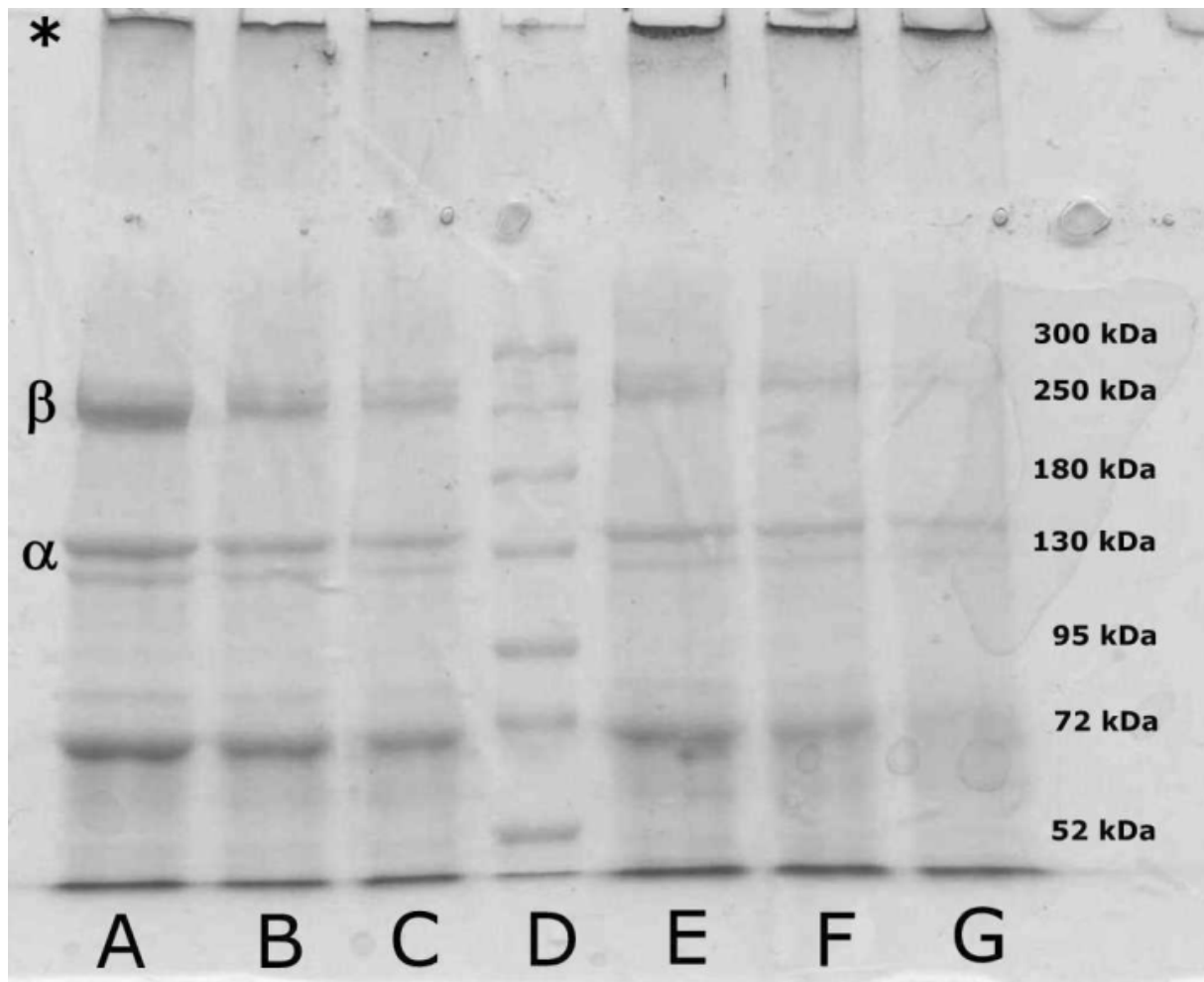


Abbildung 4.11: SDS-PAGE der Stromabioäquivalente nach Riboflavin/UVA-Behandlung; (A) unbehandeltes Stromabioäquivalent (Kontrolle); (B) mit Riboflavin inkubiertes, unbestrahltes Stromabioäquivalent; (C), (E), (F), (G): Riboflavin/UVA-behandelte Stromabioäquivalente mit einer ansteigenden Bestrahlungsdosis von 1, 2, 3 und 4 J/cm<sup>2</sup> pro Seite; (D): Molekülgrößenmarker; der Stern (\*) markiert die Bande hochmolekularer Proteine, die nicht in der Lage waren, in das Sammelgel einzutreten.

Die Übertragung dieser Methode auf in vitro kultivierte Stromabioäquivalente ergab, dass auch hier eine Verbesserung der Materialeigenschaften erzielt werden konnte, obgleich der Effekt geringer ausgeprägt war. Mittels der oszillationsrheologischen Untersuchung konnte lediglich eine Erhöhung der elastischen Komponente der Stromabioäquivalente, ausgedrückt durch den Speichermodul, um den Faktor 1,5 erzielt werden, die aber dennoch einen Anstieg

der Festkörpereigenschaften bedeutete. Der hier erzielte verfestigende Effekt war aber nicht zufriedenstellend hinsichtlich der Zielsetzung, die Biomatrix der HCC dahingehend zu erhöhen, die Handhabbarkeit während der In-vitro-Permeationsuntersuchungen deutlich zu erleichtern und eine höhere Resistenz zu erzeugen gegen die auf die HCC einwirkende hohe mechanische Belastung beim Einbringen in die für diese Experimente verwendeten modifizierten Franzzellen oder Ussing-Kammern.

Die begrenzte Eignung der Riboflavin/UVA-Methode für die Verfestigung in vitro hergestellter Stromabioäquivalente könnte darin begründet liegen, dass der Herstellungsprozess der Collagengele über eine In-situ-Gelierung einer Collagendispersion durch eine pH-Wert-Erhöhung zu einer zufälligen, völlig ungeordneten Verteilung der Collagenfibrillen führt [Ruberti und Zieske, 2008]. Somit unterscheidet sich die Anordnung deutlich von der extrem regelmäßigen, hochgeordneten Orientierung der Collagenfibrillen im nativen Gewebe. Außerdem unterscheiden sich das native Gewebe und das In-vitro-Modell im Collagengehalt. Das kontrahierte, artifizielle Stroma hat mit etwa 1,5% einen deutlich geringeren Gehalt an Collagen als das Stroma der humanen Cornea mit ca. 15% [Ruberti und Zieske, 2008]. Beide genannten Unterschiede führen vermutlich dazu, dass nicht genügend Verknüpfungsstellen für eine zufriedenstellende Quervernetzung zur Verfügung stehen. Der Herstellungsprozess des Ausgießens einer gerade gelierenden Zellsuspension erlaubt es allerdings nicht, die Collagenkonzentration wesentlich zu erhöhen, weil dadurch die Viskositätserhöhung schneller einsetzen würde, und dadurch zum einen die homogene Verteilung der Zellen im Gel deutlich erschwert werden würde und zum anderen durch die Agitation während des Pipettiervorgangs die gerade entstandene Gelstruktur zerstört werden würde.

Auch eine unzureichende Eindringtiefe der UVA-Strahlung in das Stromabioäquivalent, die nur zu einem oberflächlichen Verfestigungseffekt führen würde, könnte diskutiert werden. Untersuchungen an nativem Gewebe konnten zeigen, dass die UVA-Strahlung unter den Standardbedingungen der Riboflavin/UVA-Behandlung eine Eindringtiefe von etwa 400 µm hat, wobei die Verfestigung vor allem in den vorderen 200 µm des Stromas erfolgt, da

aufgrund des starken Absorptionskoeffizienten der Riboflavin-Lösung die UV-Intensität mit zunehmender Tiefe abnimmt [Spörl et al., 2008]. Da im Falle der Stromabioäquivalente die Bestrahlung nacheinander von beiden Seiten erfolgte, ist davon auszugehen, dass die UVA-Strahlung auf weite Bereiche der Collagenmatrix einwirken konnte. Gegen eine zu geringe Eindringtiefe spricht auch, dass die Riboflavin/UVA-Behandlung zu einer nachhaltigen Schädigung der inkorporierten HCK-Zellen geführt hatte. Wenn die Bestrahlung große Areale im Inneren nicht erreicht hätte, wäre zu erwarten gewesen, dass ausgehend von diesem vitalen Bereich in den Wochen nach der Traumatisierung eine Regeneration der Zellviabilität stattgefunden hätte.

Durch den nicht ausreichenden Verfestigungseffekt und die ausgeprägte und nachhaltige Zellschädigung, die schon bei vergleichbar geringen Bestrahlungsdosen auftrat, erwies sich die Riboflavin/UVA-Methode als ungeeignet, die biomechanischen Eigenschaften des stromalen Anteils des HCC zu verbessern. Da eine Zellschädigung auch in vivo bei der klinischen Anwendung im bestrahlten Bereich des Stromas auftritt, ist die Klärung des schädigenden Mechanismus von Interesse. Diese Experimente mittels spezieller Zellassays sind in dreidimensionalen Zellkulturmodellen durch die umgebende Extrazellulärmatrix erschwert. Deshalb wurde die Riboflavin/UVA-Behandlung, wie im Folgenden beschrieben, auf Monolayerkulturen der HCK-Zellen angewendet, um zu untersuchen, ob es sich bei der Schädigung um einen apoptotischen Vorgang oder um einen direkt zytotoxischen Prozess handelt.

#### **4.1.4 Untersuchungen an Monolayerkulturen**

Zur Klärung, ob apoptotische oder nekrotische Prozesse an der schädigenden Wirkung der Riboflavin/UVA-Behandlung beteiligt sind, wurde die Behandlung auf Monolayerkulturen der HCK-Zellen übertragen. Zur Ermittlung des hier toxisch wirkenden Bestrahlungsdosenbereichs wurden zunächst eine lichtmikroskopische Beurteilung der Kulturen sowie eine Bestimmung der Zellviabilität nach der Applikation verschieden hoher Bestrahlungsdosen durchgeführt. Im Anschluss wurden verschiedene Assays zum Nachweis

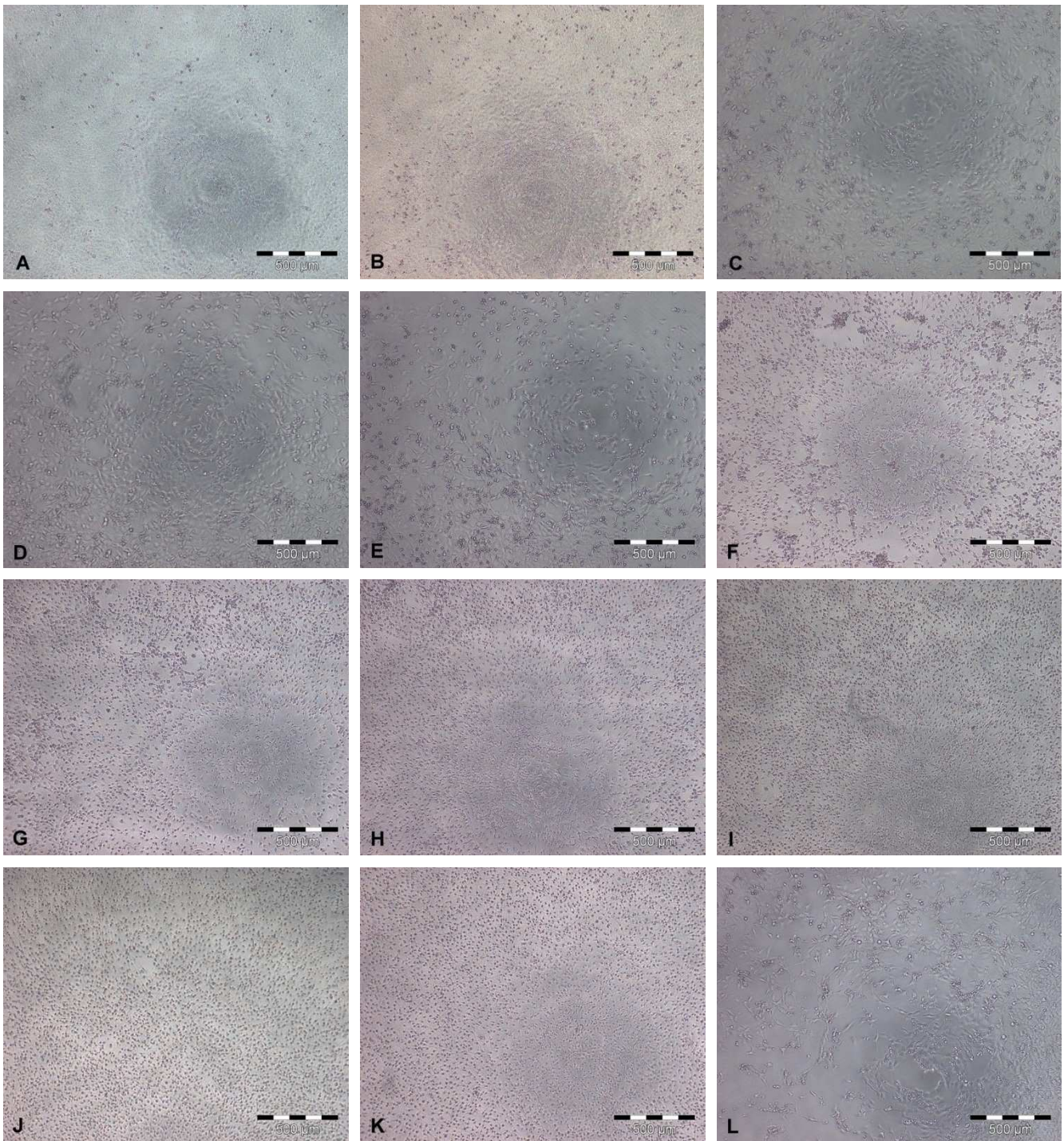


Abbildung 4.12: Lichtmikroskopische Darstellung mit Phasenkontrast des schädigenden Effektes 24 Stunden nach Riboflavin/UVA-Behandlung; (A) in F99 kultivierte Zellen als Positivkontrolle, (B) mit Riboflavin inkubierte Zellen ohne UVA-Bestrahlung; (C)-(K) Riboflavin/UVA-behandelte Zellen mit einer Bestrahlungsdosis von 0,25-2,25 J/cm<sup>2</sup>, die applizierte Bestrahlungsdosis wurde jeweils um 0,25 J/cm<sup>2</sup> erhöht; (L) mit SDS traumatisierte Zellen als Negativkontrolle; Messbalken 500 µm.

aktivierter Caspasen durchgeführt, die Auskunft über apoptotische Prozesse geben. Außerdem wurde ein Zytotoxizitätsassay angewendet, der Aufschluss über nekrotische Vorgänge gibt. Ergänzend zu diesen Assays wurde eine Visualisierung des schädigenden Effektes mittels einer Apoptose-Nekrose-Fluoreszenzfärbung vorgenommen.

#### **4.1.4.1 Mikroskopische Charakterisierung**

Die lichtmikroskopische Untersuchung der HCK-Monolayerkulturen 24 Stunden nach Einwirkung der Noxe zeigte, dass die Riboflavin/UVA-Behandlung, wie zuvor schon für die Stromabioäquivalente festgestellt wurde, zu einer dosisabhängigen Schädigung der Zellen führte (Abbildung 4.12). Die alleinige Inkubation mit Riboflavin im Zellkulturmedium (Abbildung 4.12 B) rief kaum eine erkennbare Traumatisierung im Vergleich zur Mediumkontrolle (Abbildung 4.12 A) hervor. Der Zellrasen war weiterhin geschlossen. Es waren lediglich geringfügig mehr abgerundete Zellen vorhanden. Demgegenüber war bei der zusätzlichen UVA-Exposition, insbesondere ab einer Bestrahlungsdosis von  $1,0 \text{ J/cm}^2$ , eine merkliche Zellschädigung erkennbar (Abbildungen 4.12 F-K). Der Zellrasen lockerte deutlich auf infolge der Abrundung der Zellen, die schließlich in die Ablösung von der Kultivierungsoberfläche mündete. Die am Tag des Assays als Negativkontrolle durchgeführte SDS-Inkubation der HCK-Monolayerkulturen zeigte wie erwartet eine Zellschädigung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abbildungen 4.12 A und L). Dieser Effekt stellte sich aber im Vergleich zur am Vortag durch die Riboflavin/UVA-Behandlung ausgelösten Schädigung als weniger drastisch dar.

#### **4.1.4.2 Viabilitätsmessung**

Zur weiteren Verifizierung der Schädigung wurde ebenfalls nach 24 Stunden eine Messung der Zellviabilität mittels MTT-Assay durchgeführt (Abbildung 4.13). Die zuvor bereits bei der lichtmikroskopischen Charakterisierung festgestellte Abhängigkeit des zellschädigenden

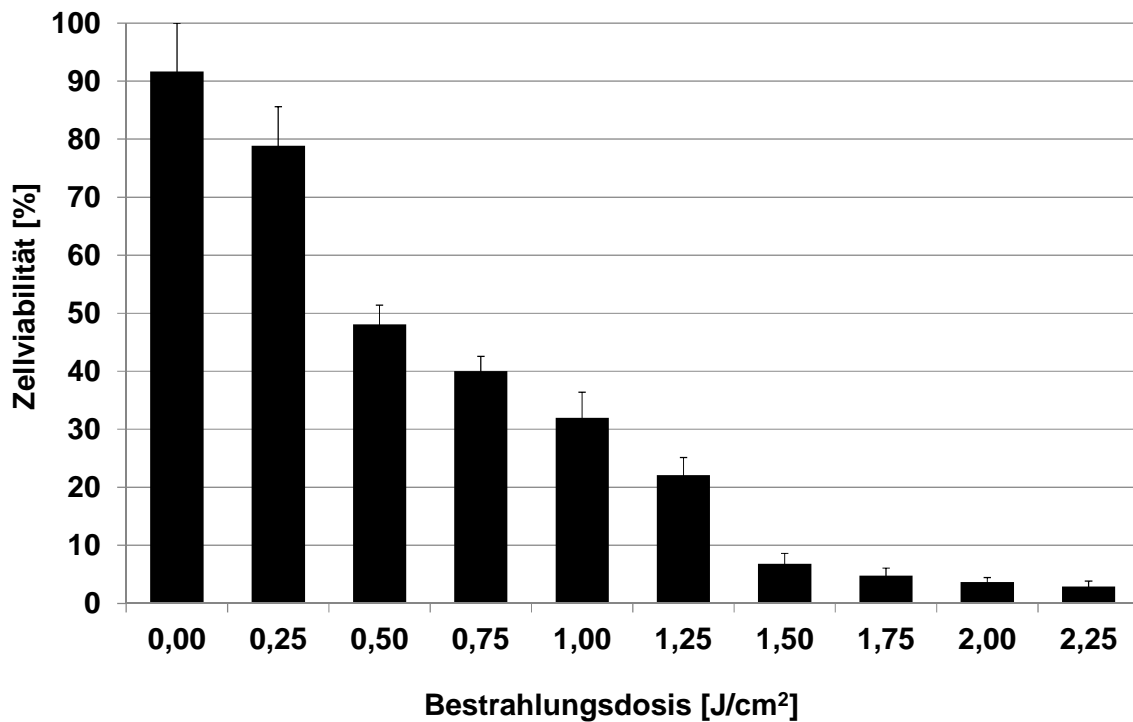


Abbildung 4.13: MTT-Assay der HCK-Monolayerkulturen 24 Stunden nach der Bestrahlung; Bestrahlungsdosis von 0-2,25 J/cm² ausgeführt in Zyklen von 0,25 J/cm² ( $\bar{x} \pm sd$ ,  $n=11$ ); als Referenz wurden in F99 kultivierte Zellen verwendet, deren Zellviabilität als 100% festgelegt wurde.

Effektes von der Bestrahlungsdosis konnte bestätigt werden. Insgesamt zeigte sich ein ähnlicher Befund wie bei der Bestimmung der Zellviabilität der Stromabioäquivalente, wenngleich sich die Monolayerkulturen als geringfügig sensitiver erwiesen. Hier war der Abfall der Zellviabilität mit zunehmender Bestrahlungsdosis anfänglich steiler, mündete aber ebenfalls in eine Zellviabilität von unter 5% bei einer Bestrahlungsdosis von 2 J/cm². Die alleinige Inkubation mit 0,1% Riboflavin im Zellkulturmedium minderte die Zellviabilität geringfügig auf etwa 91% und bestätigte somit den visuellen Befund.



#### 4.1.4.3 Apoptoseassays

Nach Ermittlung des in Monolayerkulturen schädigenden Bestrahlungsdosenbereichs wurden zur Aufklärung des Pfades der Traumatisierung verschiedene Caspase-Assays durchgeführt, die Aufschluss über apoptotische Vorgänge geben. Dabei ließ sich durch den Caspase-Glo 3/7-Assay die Aktivität der Caspasen 3 und 7 nachweisen, die als Schlüsseffektoren bei der Apoptose fungieren. Über die Assays Caspase-Glo 8 und Caspase-Glo 9 wurde zusätzlich der Weg der Apoptoseeinleitung untersucht, da die Caspase 8 den Schlüsselinitiator des extrinsischen Pfades der Caspasekaskade darstellt, während die Caspase 9 die Apoptose über den intrinsischen Weg initiiert.

Der Caspase-Glo 3/7-Assay, durchgeführt 7 Stunden nach der Schädigung, ergab weder für den niedrigeren Bestrahlungsdosenbereich bis 1,5 J/cm<sup>2</sup> noch für den höheren Bestrahlungsdosenbereich bis 4,0 J/cm<sup>2</sup> eine statistisch signifikante Ab- oder Zunahme der Caspaseaktivität (Abbildungen 4.14 A und B). Der gleiche Assay, durchgeführt 24 Stunden nach Einwirkung der Noxe, zeigte eine statistisch signifikante Erhöhung der Caspase-Aktivität bei Bestrahlungsdosen von 0,5-1,5 J/cm<sup>2</sup> im Vergleich zur unbehandelten Referenz (Abbildung 4.14 C). Dieser Effekt konnte nicht bei höheren Bestrahlungsdosen bis zu 4,0 J/cm<sup>2</sup> festgestellt werden. Bei diesen Proben nahm die Aktivität der Caspasen wieder ab, bis sie bei der höchsten applizierten Bestrahlungsdosis kaum noch messbar war (Abbildung 4.14 D). Bei den Proben, die ausschließlich mit riboflavinhaltigem Medium inkubiert wurden, war keine signifikante Änderung der Caspaseaktivität feststellbar im Vergleich zur Mediumkontrolle.

Die Untersuchung des Pfades der Apoptoseeinleitung ergab, dass die Aktivität sowohl der Caspase 8 als auch der Caspase 9 durch die Kombination von Riboflavin und UVA-Bestrahlungsdosen von 0,5-1,5 J/cm<sup>2</sup> statistisch signifikant erhöht wurde (Abbildung 4.15 A und B). Es waren also der extrinsische sowie der intrinsische Initiationsweg der Apoptose beteiligt. In Übereinstimmung mit dem zuvor durchgeführten Caspase-Glo 3/7-Assay zeigte die alleinige Inkubation mit Riboflavin-haltigem Medium ohne eine Bestrahlung keine signifikante Zu- oder Abnahme der Aktivitäten der Caspasen 8 und 9.

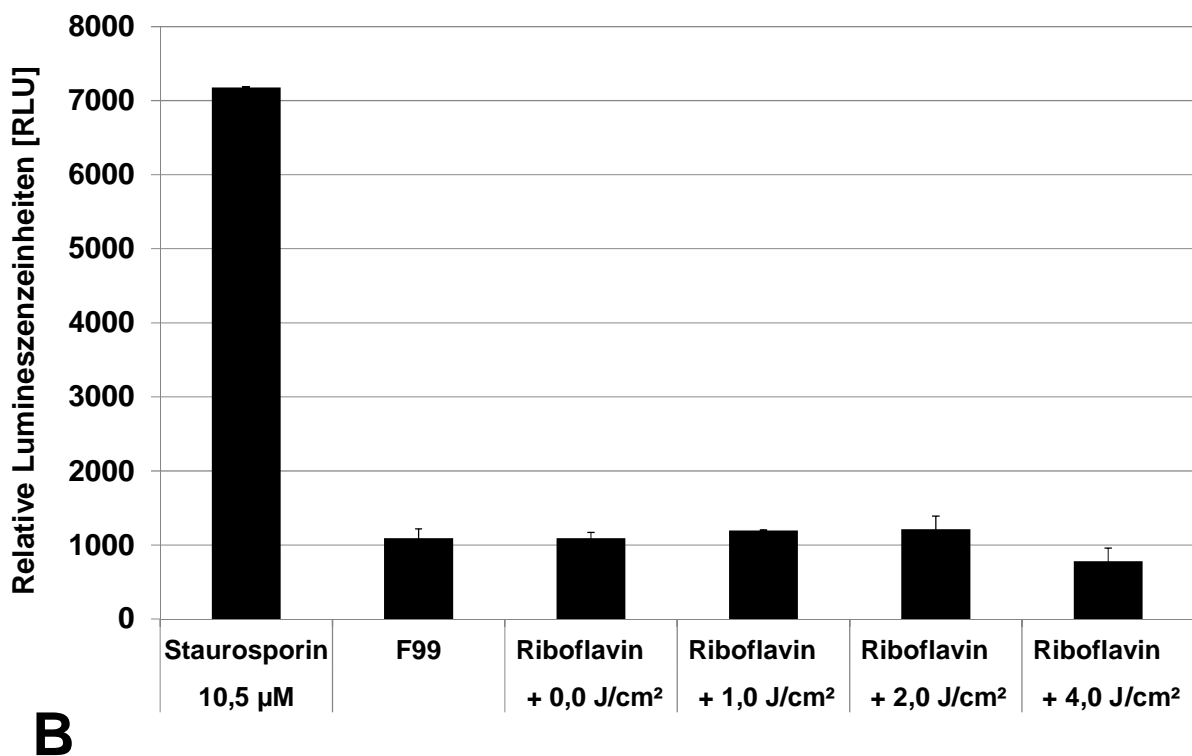
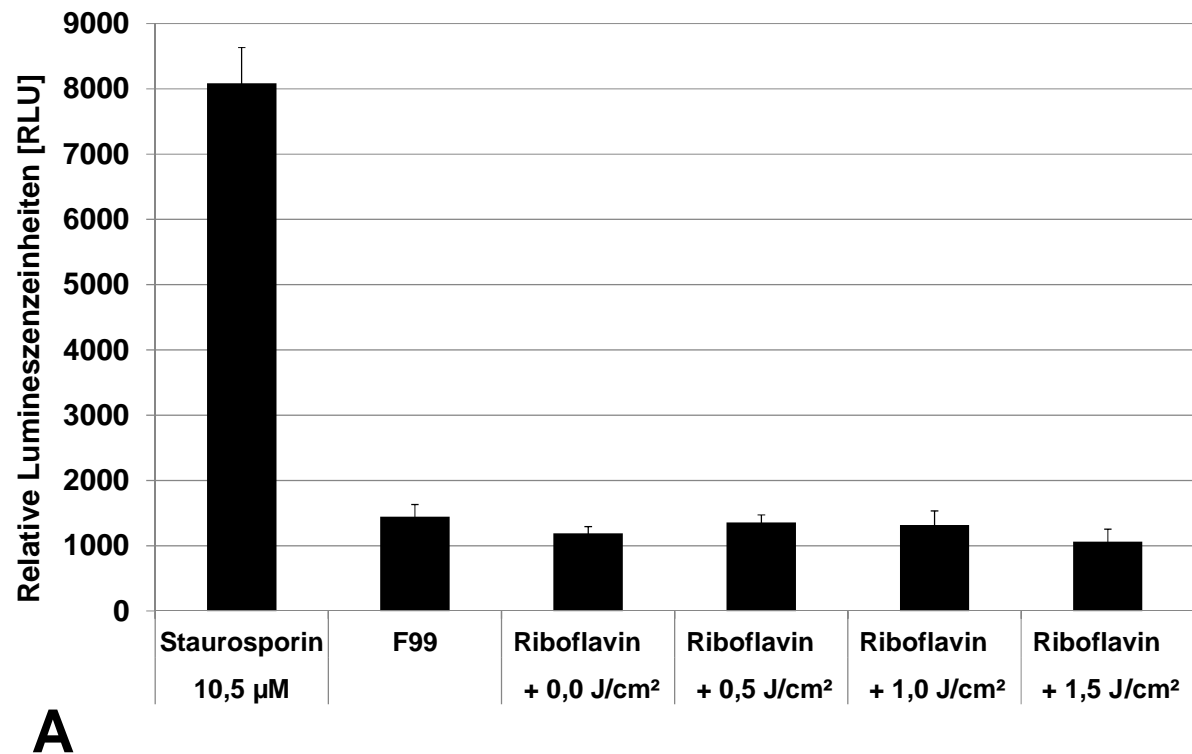


Abbildung 4.14 (A) und (B): Caspase-Glo 3/7-Assay 7 Stunden nach Riboflavin/UVA-Behandlung ( $\bar{x} \pm sd$ ,  $n=3$ ); die Bestrahlungsdosis betrug 0,0-1,5 J/cm² im Falle der Darstellung (A) bzw. 0,0-4,0 J/cm² im Falle der Darstellung (B).



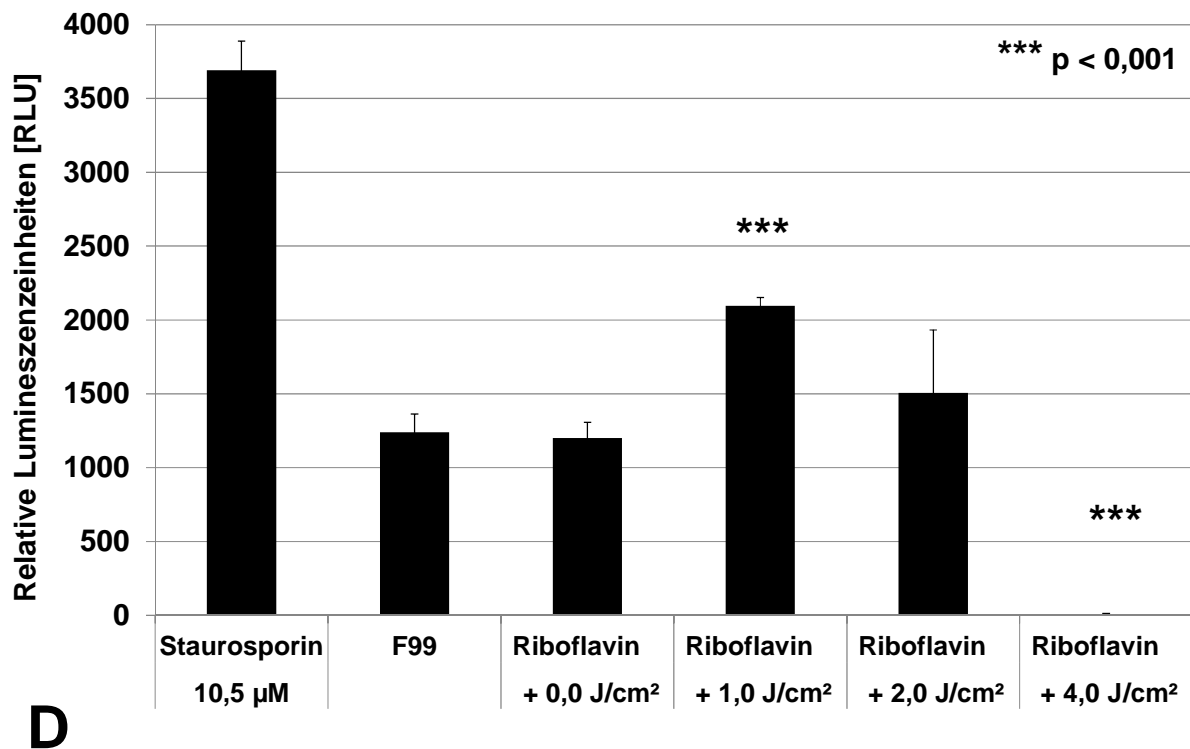
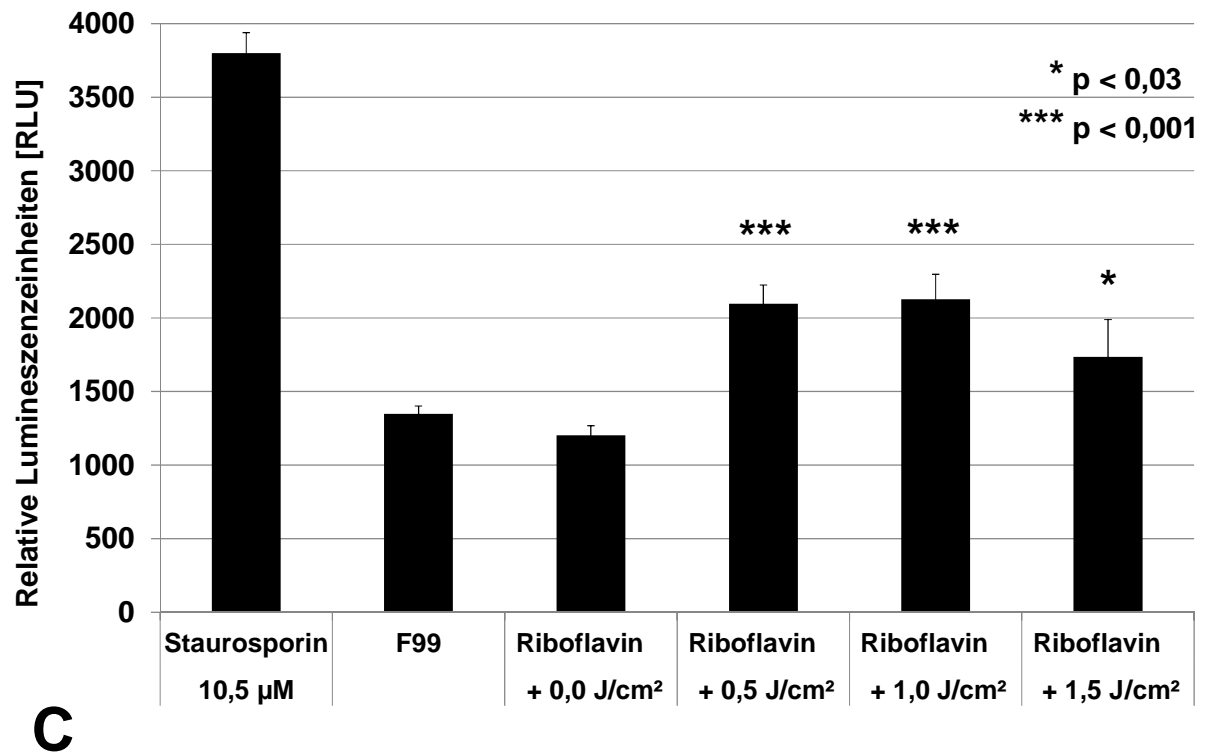


Abbildung 4.14 (C) und (D): Caspase-Glo 3/7-Assay 24 Stunden nach Riboflavin/UVA-Behandlung ( $\bar{x} \pm sd$ ,  $n=4$ ); die Bestrahlungsdosis betrug 0,0-1,5 J/cm<sup>2</sup> im Falle der Darstellung (C) bzw. 0,0-4,0 J/cm<sup>2</sup> im Falle der Darstellung (D).

Das Mycotoxin Staurosporin, das bekanntermaßen in verschiedenen Zellarten apoptotische Prozesse auszulösen vermag, konnte auch in der immortalisierten HCK-Zelllinie als Positivkontrolle der Caspase-Assays eingesetzt werden [Bertrand et al., 1994; Andersson et al., 2000; Belmokhtar et al., 2001]. Es verursachte eine deutliche Aktivitätssteigerung sowohl der Initiatorcaspasen 8 und 9 als auch der nachgeschalteten Effektorcaspasen 3 und 7. Insgesamt betrachtet sind die HCK-Zellen in der Lage, wie für andere immortalisierte corneale Epithel- und Endothelzellen bereits beschrieben, typische Merkmale apoptotischer Vorgänge aufzuzeigen [Härtel et al., 2003; Thuret et al., 2003].

#### **4.1.4.4 Zytotoxizitätsassay**

In Ergänzung zur Untersuchung apoptotischer Prozesse wurde zeitgleich der direkt zytotoxische Effekt der Riboflavin/UVA-Behandlung betrachtet. Dafür wurde jeweils parallel der CytoTox-Glo-Assay an Zellen durchgeführt, die derselben Noxe ausgesetzt waren.

Für den niedrigeren Bestrahlungsdosenbereich bis zu 1,5 J/cm<sup>2</sup> war 24 Stunden nach der Schädigung für alle hier getesteten Bestrahlungsdosen ein leichter, aber statistisch signifikanter Anstieg des Anteils toter Zellen messbar (Tabelle 4.1). Der Anteil toter Zellen nahm mit Erhöhung der Bestrahlungsdosis zu. Zum Zeitpunkt 7 Stunden nach der Traumatisierung waren die Messwerte nicht ganz konsistent. Während die Bestrahlungsdosen von 0,5 J/cm<sup>2</sup> und 1,0 J/cm<sup>2</sup> zu einer statistisch signifikanten Zunahme des Anteils toter Zellen führten, war der zytotoxische Effekt für die höhere Bestrahlungsdosis von 1,5 J/cm<sup>2</sup> nicht signifikant unterschiedlich zur Mediumkontrolle.

Der höhere Bestrahlungsdosenbereich von bis zu 4,0 J/cm<sup>2</sup> resultierte nach 24 Stunden in einer höchstsignifikanten und dosisabhängigen Zunahme des Anteils toter Zellen (Tabelle 4.2). Dieser Effekt zeichnete sich bereits 7 Stunden nach der Riboflavin/UVA-Behandlung ab. Zu diesem Zeitpunkt war der Anstieg des Anteils toter Zellen bereits signifikant für die Bestrahlungsdosis von 2,0 J/cm<sup>2</sup> und höchstsignifikant für die Bestrahlungsdosis von 4,0 J/cm<sup>2</sup>.

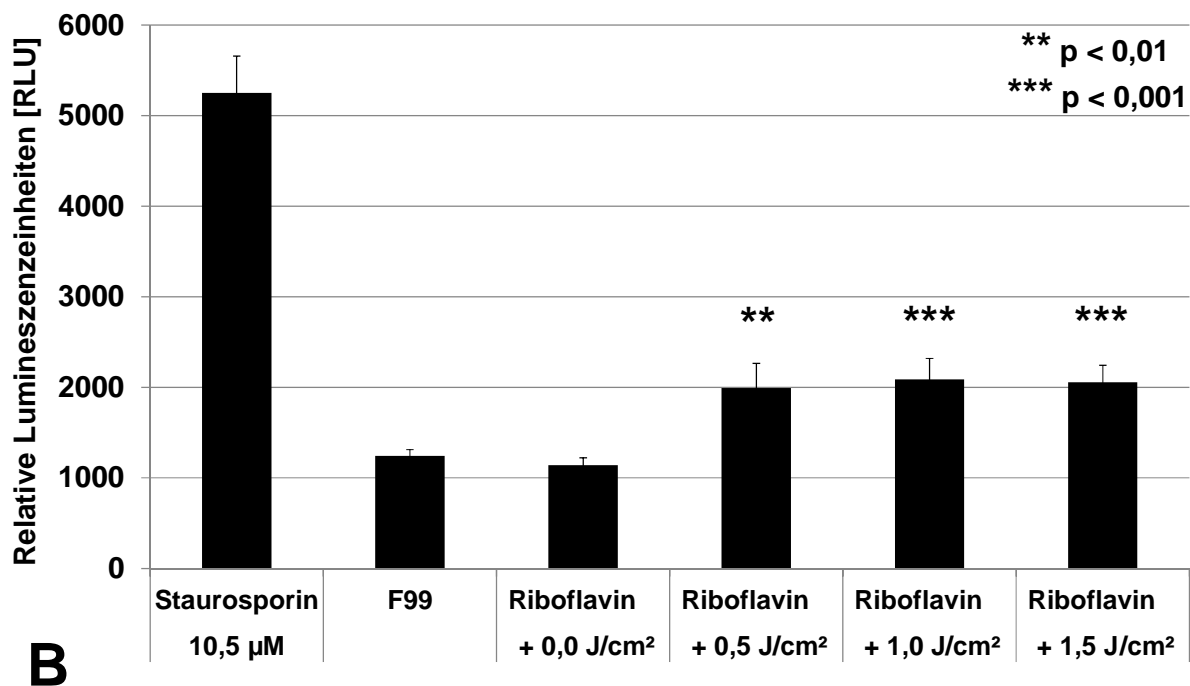
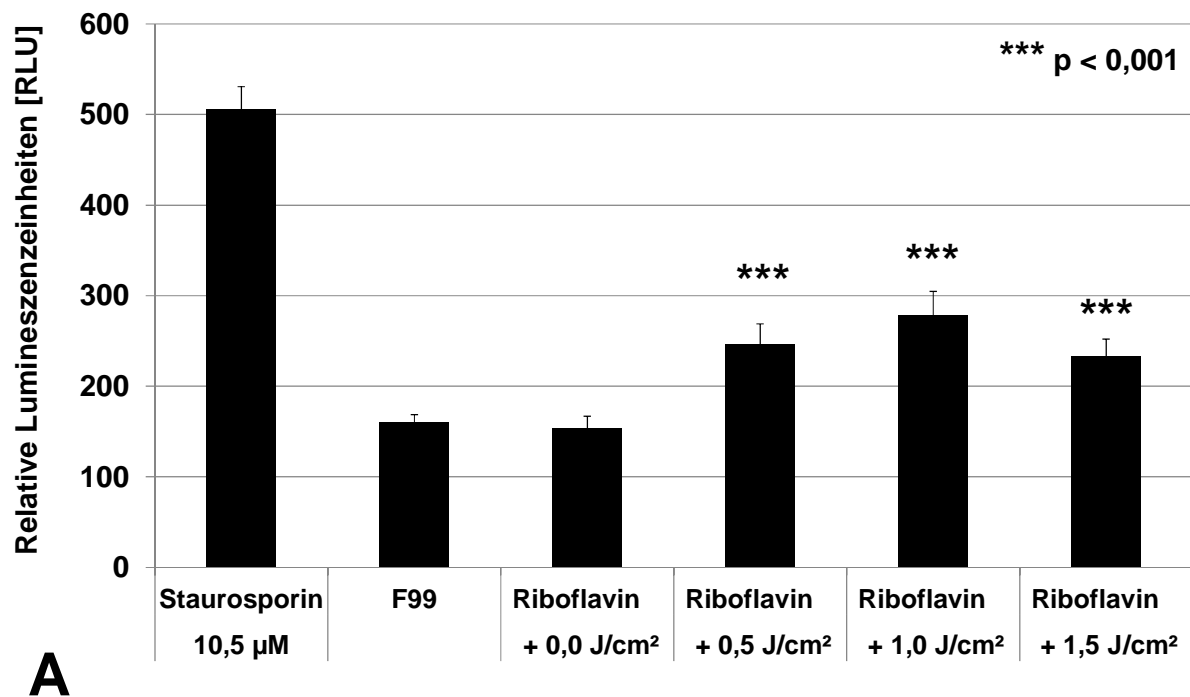


Abbildung 4.15: Caspase-Glo 8-Assay (A) und Caspase-Glo 9-Assay (B) 24 Stunden nach der Riboflavin/UVA-Behandlung mit einer Bestrahlungsdosis von 0,0-1,5 J/cm² ( $\bar{x} \pm sd$ , n= 4).

Tabelle 4.1: CytoTox-Glo-Assay 7 Stunden sowie 24 Stunden nach Riboflavin/UVA-Behandlung mit einer Bestrahlungsdosis von 0-1,5 J/cm<sup>2</sup>; relativer Anteil toter Zellen ( $\bar{x} \pm sd$ ; n=4; \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001). Die statistische Auswertung der Messwerte erfolgte bezugnehmend auf unbehandelte Zellen (F99).

		SDS	F99	Riboflavin	Riboflavin	Riboflavin	Riboflavin
				+ 0,0 J/cm <sup>2</sup>	+ 0,5 J/cm <sup>2</sup>	+ 1,0 J/cm <sup>2</sup>	+ 1,5 J/cm <sup>2</sup>
nach	$\bar{x}$	75,0%	11,2%	16,0%	*14,3%	*16,2%	14,7%
7 h	$sd$	±6,5%	±2,2%	±7,5 %	±1,3%	±2,8%	±2,9%
nach	$\bar{x}$	74,5%	10,4%	8,4%	**19,7%	***20,8 %	***22,7%
24 h	$sd$	±5,4%	±0,9%	±0,9%	±3,5%	±2,1%	±0,9%

Tabelle 4.2: CytoTox-Glo-Assay 7 Stunden sowie 24 Stunden nach Riboflavin/UVA-Behandlung mit einer Bestrahlungsdosis von 0-4,0 J/cm<sup>2</sup>; relativer Anteil toter Zellen ( $\bar{x} \pm sd$ ; n=4; \*p < 0,05; \*\*\*p < 0,001). Die statistische Auswertung der Messwerte erfolgte bezugnehmend auf unbehandelte Zellen (F99).

		SDS	F99	Riboflavin	Riboflavin	Riboflavin	Riboflavin
				+ 0,0 J/cm <sup>2</sup>	+ 1,0 J/cm <sup>2</sup>	+ 2,0 J/cm <sup>2</sup>	+ 4,0 J/cm <sup>2</sup>
nach	$\bar{x}$	73,5%	7,2%	11,0%	16,7%	*19,0%	***21,2%
7 h	$sd$	±9,8%	±0,7%	±4,5%	±6,5%	±5,2%	±3,3%
nach	$\bar{x}$	78,4%	10,4%	10,3%	***38,5%	***62,7%	***94,1%
24 h	$sd$	±4,0%	±1,1%	±2,0%	±1,3%	±5,0%	±4,6%

Wie zuvor schon für die Betrachtung der apoptotischen Vorgänge festgestellt wurde, führte die alleinige Inkubation mit riboflavinhaltigem Medium auch zu keiner messbaren nekrotischen Schädigung der Kulturen, da die Messwerte keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Mediumkontrolle aufwiesen. Die als Positivkontrolle für Nekrose eingesetzte SDS-Lösung verursachte jeweils eine Zunahme des Anteils toter Zellen auf über 70% (Tabellen 4.1 und 4.2).

#### **4.1.4.5 Apoptose-Nekrose-Fluoreszenzfärbung**

Die Visualisierung der apoptotischen und nekrotischen Schädigungsanteile erfolgte mittels einer Apoptose-Nekrose-Fluoreszenzfärbung. Bei dieser Färbung, deren Prinzip bereits unter 2.6.4 erläutert wurde, wiesen frühapoptotische Zellen ausschließlich eine grüne Fluoreszenz auf, während spätapoptotische Zellen zusätzlich rote Fluoreszenz zeigten. Nekrotische Zellen wurden durch eine rote Fluoreszenz erkannt, die allerdings von grüner Fluoreszenz begleitet werden konnte. Vitale Zellen ergaben keine Fluoreszenz.

Bei dieser Färbung konnte bereits 4 Stunden nach der Riboflavin/UVA-Behandlung eine Zunahme der grünen Fluoreszenz für niedrigere Bestrahlungsdosen beobachtet werden, die auf frühe apoptotische Prozesse hinwies (Abbildung 4.16). Besonders gut erkennbar war dieser Befund bei den Bestrahlungsdosen von 1,0 J/cm<sup>2</sup> und 1,5 J/cm<sup>2</sup>. Für die höheren Bestrahlungsdosen, vor allem bei der höchsten Bestrahlungsdosis von 4,0 J/cm<sup>2</sup>, nahm außerdem die rote Fluoreszenz zu und zeigte damit einen frühen Verlust der Membranintegrität an, der auf einen nekrotischen Prozess hindeutete.

Staurosporin konnte wieder als Positivkontrolle für apoptotische Vorgänge eingesetzt werden. Die Nutzung der SDS-Lösung als Positivkontrolle für nekrotische Prozesse war in diesem Fall nicht zufriedenstellend, da aufgrund der zahlreichen notwendigen Waschschriffe geschädigte Zellen abgespült wurden.

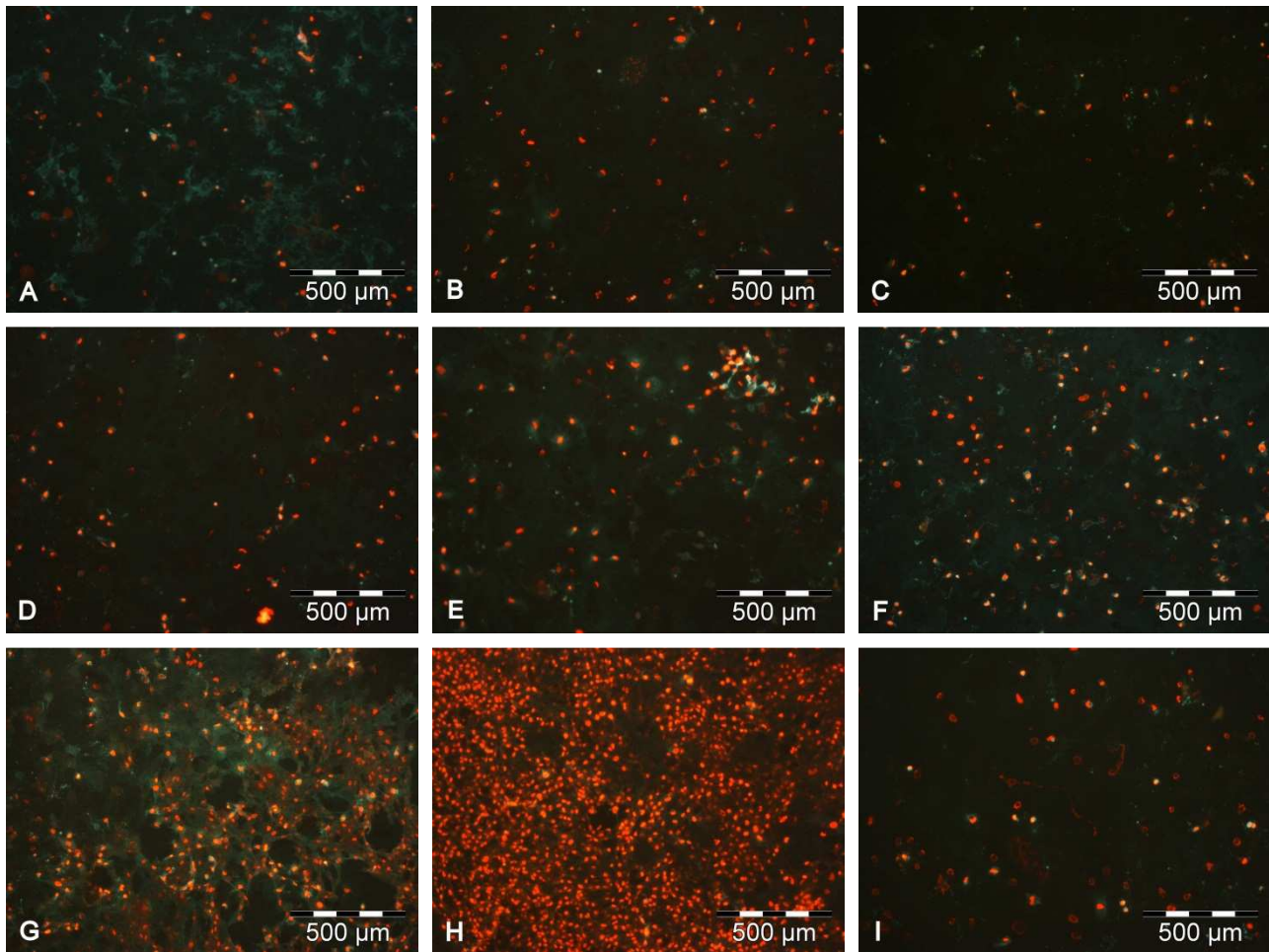


Abbildung 4.16: Apoptose-Nekrose-Fluoreszenzfärbung 4 h nach der Riboflavin/UVA-Behandlung mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff Ethidium Homodimer III (EtD) und dem grünen Fluoreszenzkonjugat FITC-Annexin V (AV); apoptotische Zellen (EtD - / AV +), nekrotische Zellen (EtD + / AV +) oder (EtD + / AV -), vitale Zellen (EtD - / AV -); (A) mit Staurosporin inkubierte Zellen als Positivkontrolle für Apoptose, (B) mit F99 inkubierte Zellen als Negativkontrolle, (C) mit Riboflavin inkubierte Zellen ohne UVA-Bestrahlung; (D)-(H) Riboflavin/UVA-behandelte Zellen mit einer Bestrahlungsdosis von 0,5 J/cm<sup>2</sup>, 1,0 J/cm<sup>2</sup>, 1,5 J/cm<sup>2</sup>, 2,0 J/cm<sup>2</sup> bzw. 4,0 J/cm<sup>2</sup>; (I) mit SDS traumatisierte Zellen als Positivkontrolle für Nekrose; Messbalken 500 µm.

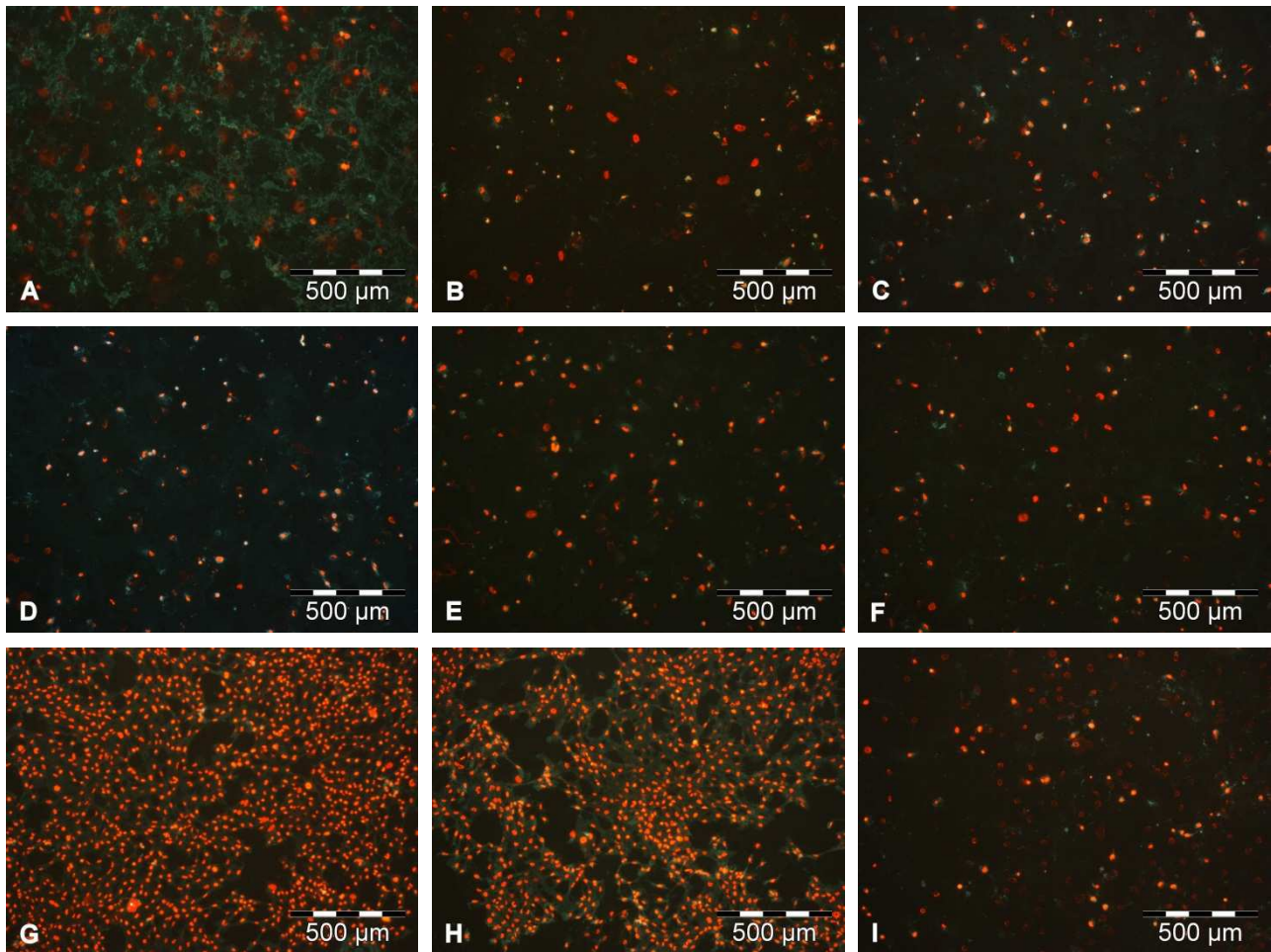


Abbildung 4.17: Apoptose-Nekrose-Fluoreszenzfärbung 7 h nach der Riboflavin/UVA-Behandlung mit dem roten Fluoreszenzfarbstoff Ethidium Homodimer III (EtD) und dem grünen Fluoreszenzkonjugat FITC-Annexin V (AV); apoptotische Zellen (EtD - / AV +), nekrotische Zellen (EtD + / AV +) oder (EtD + / AV -), vitale Zellen (EtD - / AV -); (A) mit Staurosporin inkubierte Zellen als Positivkontrolle für Apoptose, (B) mit F99 inkubierte Zellen als Negativkontrolle, (C) mit Riboflavin inkubierte Zellen ohne UVA-Bestrahlung; (D)-(H) Riboflavin/UVA-behandelte Zellen mit einer Bestrahlungsdosis von 0,5 J/cm<sup>2</sup>, 1,0 J/cm<sup>2</sup>, 1,5 J/cm<sup>2</sup>, 2,0 J/cm<sup>2</sup> bzw. 4,0 J/cm<sup>2</sup>; (L) mit SDS traumatisierte Zellen als Positivkontrolle für Nekrose; Messbalken 500 µm.

Die gleiche Fluoreszenzfärbung lieferte bei Durchführung 7 Stunden nach der Riboflavin/UVA-Behandlung ein sehr ähnliches Ergebnis, wenngleich jeweils der Anteil bereits toter Zellen größer war (Abbildung 4.17). Insbesondere bei der Bestrahlungsdosis von  $2,0 \text{ J/cm}^2$  war eine deutliche Zunahme erkennbar (Abbildung 4.17 G). Bei der als Positivkontrolle für Apoptose eingesetzten Staurosporin-Lösung war, abgesehen von dem Fortschreiten der apoptotischen Vorgänge, auch eine vermehrte rote Fluoreszenz erkennbar, die eine Erhöhung des Anteils bereits toter Zellen anzeigte. Bei der höchsten Bestrahlungsdosis von  $4,0 \text{ J/cm}^2$  erschien der Zellrasen schon deutlich aufgelockert. Vermutlich hatte die Traumatisierung bereits zu einem Ablösen der Zellen geführt. Des Weiteren war hier erkennbar, dass im Vergleich zum Zeitpunkt 4 Stunden nach der Schädigung die grüne Fluoreszenz stärker ausgeprägt war. Das kann dadurch erklärt werden, dass das FITC-Annexin V-Konjugat nun Phosphatidylserin auf der inneren Membranseite gebunden hatte.

#### **4.1.4.6 Zusammenfassende Diskussion zu Untersuchungen an Monolayerkulturen**

Die Anwendung der Riboflavin/UVA-Behandlung auf Monolayerkulturen der HCK-Zellen ergab, dass der schädigende Effekt im gleichen Bestrahlungsdosenbereich auftrat wie zuvor für die 3D-Kultur der HCK-Zellen, den Stromabioäquivalenten, ermittelt wurde. Die Kultivierung als Monolayer erlaubte dann weiterhin eine Untersuchung des der Schädigung zugrundeliegenden Mechanismus, der höchstwahrscheinlich auf die gleiche Weise die Schädigung in den Stromabioäquivalenten vermittelte. Außerdem war auf diese Weise eine visuelle Beurteilung der Traumatisierung besser möglich. Infolge der Riboflavin/UVA-Behandlung kugelten sich die Zellen ab und erschienen nach 24 Stunden deutlich verkleinert. Ein Vergleich der lichtmikroskopischen Charakterisierung und der Zellviabilität zeigt, dass die Zellen trotz deutlich sichtbarer Beeinträchtigung ihre Stoffwechselaktivität noch nicht vollständig eingebüßt hatten. Das kann als ein Hinweis für ein apoptotisches Zellsterben gedeutet werden, da es sich dabei um einen einige Zeit in Anspruch nehmenden, gesteuert ablaufenden, energieabhängigen Prozess handelt [Kanduc et al., 2002]. Durch die



deutliche Volumenabnahme der Zellen erschien die Schädigung durch die Riboflavin/UVA-Behandlung schwerwiegender als die als Positivkontrolle eingesetzte SDS-Schädigung, die durch die Lyse der Zellmembran direkt zytotoxisch wirkt. Der Zytotoxizitätsassay konnte aber zeigen, dass der Anteil toter Zellen auch hier deutlich erhöht wurde.

Insgesamt verursachte die Riboflavin/UVA-Behandlung eine ausgeprägte Schädigung der HCK-Zellen sowohl im dreidimensionalen Stromabioäquivalent als auch in der zweidimensionalen Kultivierung als Monolayer, die sich in einer markanten Abnahme der Zellviabilität ausdrückte und das bei einer UVA-Bestrahlung, die im Vergleich zur klinisch angewendeten Dosis relativ gering war. Anders als beim Zellkulturmodell ist in vivo aber eine Regeneration der stromalen Zellen möglich [Spörl et al., 2007]. Die beobachtete Viabilitätsminderung wies eine klare Abhängigkeit von der Höhe der applizierten Bestrahlungsdosis auf. Die genauere Untersuchung des Pfades der Abnahme der Zellviabilität zeigte, dass nach 24 Stunden die Aktivität der Caspasen 3 und 7 erhöht war für Bestrahlungsdosen bis zu 1,5 J/cm<sup>2</sup>. Das bedeutet, dass hier ein apoptotisches Zellsterben stattfand. Der Befund, dass der parallel dazu durchgeführte Zytotoxizitätsassay auch einen erhöhten Anteil bereits toter Zellen anzeigte, muss nicht zwingend als ein direkt zytotoxischer Effekt der Riboflavin/UVA-Behandlung interpretiert werden. In Abwesenheit phagozytierender Zellen, wie es in vitro der Fall ist, kann in einem späten Stadium der Apoptose sekundäre Nekrose stattfinden, die mit dem Verlust der Membranintegrität und Zelllyse sowie der Freisetzung derjenigen Proteasen einhergeht, die das Target des eingesetzten Zytotoxizitätsassays darstellt [Collins et al., 1997; Darzynkiewicz et al., 1997; O'Brien et al., 1997]. Hingegen war bei der Applikation höherer Bestrahlungsdosen die Reduktion der Zellviabilität eher durch einen nekrotischen Prozess bedingt, da der Anteil toter Zellen deutlich zunahm, während die Aktivität der Caspasen 3 und 7 reduziert bis kaum messbar war. Die Apoptose-Nekrose-Fluoreszenzfärbung bestätigte die Erkenntnisse dieser beiden Lumineszenzassays. Bei den niedrigeren Bestrahlungsdosen zeigte sich überwiegend eine Zunahme der grünen Fluoreszenz, die der Translokation von Phosphatidylserin auf die Membranaußenseite entspricht, einem Ereignis während des

Apoptosevorgangs, das dem Zerfall der Zelle in Apoptosekörperchen vorangeht [Höffeler, 2004]. Außerdem zeigten die höheren Bestrahlungsdosen zusätzlich eine massive Zunahme an roter Fluoreszenz, die einen Verlust der Membranintegrität nachwies, und das bereits 4 Stunden nach Einwirkung der schädigenden Noxe.

Schließlich untermauerten die Untersuchungen der Aktivitäten der Caspasen 8 und 9, dass die Riboflavin/UVA-Behandlung im niedrigeren Bestrahlungsdosenbereich bis zu  $1,5 \text{ J/cm}^2$  zu einem apoptotischen Zellsterben über eine Aktivierung sowohl des intrinsischen als auch des extrinsischen Pfades der Caspasekaskade führte.

Unter Beachtung, dass Nekrose ein schnell ablaufender Prozess ist, der seinen Ausgang an der Zelloberfläche hat und mit einer raschen Zerstörung der Zellmembran einhergeht, während Apoptose ein wesentlich langsamer verlaufender, streng kontrollierter Prozess ist, der seinen Ursprung im Zellkern hat, kann aus den hier vorliegenden Ergebnissen die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Riboflavin/UVA-Behandlung mit niedrigeren Bestrahlungsdosen Apoptose induzierte, aber für die höheren Bestrahlungsdosen ein direkt zytotoxischer Effekt dominierte, der zu Nekrose führte [Collins et al., 1997]. Andere Studien konnten bereits zeigen, dass die Intensität einer schädigenden Noxe über die Prävalenz von Apoptose oder Nekrose entscheiden kann [Leist und Nicotera, 1997; Gaunitz und Heise, 2003].

Die schädigenden Auswirkungen der Riboflavin/UVA-Behandlung wurden zuvor auch schon von anderen Gruppen untersucht. Wollensak et al. führten dazu Experimente an porcinen Endothelzellen und Keratozyten durch [2003e, 2004a]. Die Gruppe ermittelte in Monolayerkulturen der porcinen Zellen bei einer Bestrahlungsdauer von 30 Minuten jeweils einen Schwellenwert für die Bestrahlungsstärke, ab dem eine Schädigung auftrat. Dieser Schwellenwert lag für die cornealen Endothelzellen bei einer Bestrahlungsstärke von  $0,35 \text{ mW/cm}^2$  und für die Keratozyten bei  $0,5 \text{ mW/cm}^2$ . Das entspricht einer Bestrahlungsdosis von  $0,63 \text{ J/cm}^2$  bzw.  $0,9 \text{ J/cm}^2$ . Der schädigende Effekt wurde dabei anhand einer Färbung mit Trypanblau und YOPRO beurteilt. Der anionische Farbstoff Trypanblau kann nach Zerstörung der Zellmembran in die Zelle eindringen und dort an

Proteine binden und somit tote Zellen durchgängig blau anfärben [Lindl, 1994]. Der Fluoreszenzfarbstoff YOPRO dagegen vermag in apoptotische Zellen einzudringen [Idziorek et al., 1995]. Da für beide Farbstoffe jeweils der gleiche Schwellenwert ermittelt wurde, schlussfolgerte die Gruppe, dass der schädigende Effekt auf nekrotische Prozesse zurückzuführen sei. Allerdings wurden die Experimente erst 24 Stunden nach Einwirkung der Noxe durchgeführt und könnten somit durch sekundärnekrotische Prozesse infolge einer Apoptose überlagert sein. In beiden Studien wurde außerdem gefunden, dass Riboflavin als Photosensibilisator den Schwellenwert für die Traumatisierung durch UVA-Strahlung etwa um den Faktor 10 senkt. Für Riboflavin allein wurde keine Beeinträchtigung der Kulturen gefunden, was mit den Ergebnissen der hier beschriebenen Untersuchungen übereinstimmt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Studien von Wollensak et al., die einen Schwellenwert ermittelten, ab dem eine Schädigung auftrat, ergaben die hier dargestellten Untersuchungen, dass die Zellviabilität von Beginn an sukzessive durch die Erhöhung der Bestrahlungsdosis beeinträchtigt wurde.

In weiterführenden In-vivo-Experimenten an Kaninchen konnten Wollensak et al. auch apoptotische Vorgänge infolge der Riboflavin/UVA-Behandlung in cornealen Endothelzellen und Keratozyten nachweisen [2003c, 2004b]. Mittels TUNEL-Assay und Transmissionselektronenmikroskopie konnten sie jeweils 24 Stunden postoperativ neben vollständig zerstörten nekrotischen Zellen auch einige apoptotische Zellen nachweisen. Zum Zeitpunkt 4 Stunden postoperativ konnte allerdings noch keine gesteigerte Apoptoserate im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Der traumatisierende Effekt stellte sich auch als dosisabhängig dar, da die Tiefe, in der eine Schädigung der Keratozyten auftrat, von der applizierten Bestrahlungsdosis abhängig war.

Der schädigende Effekt der Riboflavin/UVA-Methode wird zum einen durch die UVA-Bestrahlung selbst, aber vor allem durch die induzierten freien Radikale vermittelt, die eine photochemische Schädigung verursachen [Spörl et al., 2007]. Cho et al. nutzten Riboflavin und weißes Licht, um in bovinen cornealen Endothelzellen reaktive Sauerstoffspezies zu erzeugen [1999]. Neben einer signifikanten Abnahme der Zellviabilität konnten sie sowohl

apoptotische als auch nekrotische Prozesse nachweisen und schlussfolgerten, dass niedrige Level reaktiver Sauerstoffspezies Apoptose induzierten, aber höhere Level hingegen zu Nekrose führten.

Ein weiterer Nachweis für apoptotische Prozesse infolge der kombinierten Riboflavin/UVA-Behandlung konnte von Wang erbracht werden [2008]. In dieser Studie wurde die Methode eingesetzt, um in muriner Cornea stromale Zellen sowie antigenpräsentierende Zellen zu eliminieren mit dem Ziel, das Risiko von Abstoßungsreaktionen bei Transplantation zu vermindern. Neben der Dezellularisierung im bestrahlten, zentralen Bereich der Cornea konnte die Gegenwart von Caspase 3 mittels Immunhistochemie und Western Blot nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich die Nachhaltigkeit der Schädigung in einer Zunahme toter Zellen über die Kultivierungsdauer.

#### **4.2 Studie zur Stimulation der Synthese extrazellulärer Matrix in stromalen Zellen**

Anders als bei der zuvor beschriebenen Studie, bei der die stromalen Zellen in eine artifizielle Collagenmatrix eingebracht wurden, befasste sich der zweite Themenkomplex dieser Arbeit mit der Stimulation der endogenen Collagensynthese in stromalen Zellen. Ein solcher Ansatz ist weniger auf die Entwicklung von In-vitro-Modellen ausgerichtet, sondern ist als Grundstein für die Gewinnung von transplantierbarem cornealen Gewebeersatz zu betrachten. Bei dem zuvor eingehend beschriebenen HCC für Arzneistoffabsorptionsuntersuchungen zeichnete sich die artifizielle Matrix dadurch aus, dass die collagenen Fasern in einem völlig ungeordneten Zustand vorlagen, wodurch sich zum einen die gering ausgeprägten biomechanischen Eigenschaften und zum anderen auch die Opazität des Konstruktes ableiteten. Um ein Gewebeäquivalent zu erzeugen, das die In-vivo-Bedingungen möglichst gut nachstellt, insbesondere hinsichtlich der Festigkeit und Transparenz, muss ein anderer Kultivierungsansatz verfolgt werden. Durch die Langzeitkultivierung unter Supplementierung des Zellkulturmediums mit Vitamin C, einem essentiellen Cofaktor bei der Synthese eines wichtigen Aminosäurebausteins des Collagenmoleküls, wurden stromale Zellen angeregt, die sie umgebende extrazelluläre Matrix selbst zu bilden.

Um zukünftig einen möglichen cornealen Gewebeersatz transplantieren zu können, wurden für diese Studie stromale Zellen primären Ursprungs verwendet. Von diesen Zellen war bereits bekannt, dass sie auf Vitamin C mit einer gesteigerten Synthese verschiedener Collagene reagieren [Stoesser et al., 1978; Grinnell et al., 1989; Ruggiero et al., 1996; Du et al., 2007; Guo et al., 2007]. Allerdings wurden bisher noch keine systematischen Untersuchungen zur Deposition der extrazellulären Matrix über die Kultivierungsdauer und zu den biomechanischen Eigenschaften so gezüchteter Kulturen beschrieben. Parallel zu den primären cornealen Stromazellen wurde außerdem untersucht, ob die im ersten Teil der Arbeit eingesetzte immortalisierte HCK-Zelllinie ebenfalls auf eine Vitamin C-Stimulation anspricht, da zu dieser Thematik noch keine Literaturdaten vorhanden sind.

In den Langzeitkulturen wurden neben dem Gehalt an Collagen und Glykosaminoglykanen auch die Zellproliferation und die Zellviabilität über die Zeit betrachtet. Die Gegenwart von Collagen Typ I und Typ III wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz sowie mittels Western Blot nach gelelektrophoretischer Trennung untersucht. Außerdem wurden bei den unter diesen Kultivierungsbedingungen entstehenden zusammenhängenden Zellrasen ihre Lichttransmission und ihre Ultrastruktur sowie die Parameter Elastizitätsmodul und Zugfestigkeit betrachtet, die Aufschluss über die biomechanischen Eigenschaften geben.

### **4.2.1 Langzeitkultivierung von stromalen Zellen**

Sowohl die primären als auch die immortalisierten humanen stromalen Zellen ließen sich ohne ein Passagieren der Kulturen über mehrere Wochen kultivieren. Das Ergebnis waren sehr dicht gewachsene Zellrasen (Abbildung 4.18), die bereits ein mehrschichtiges Wachstum aufzeigten. Dieses war besonders deutlich für die HuFib-Zellen erkennbar, da durch ihre Spindelform ein Alternieren der Wachstumsrichtung gut erkennbar war (Abbildung 4.18 B). Für die HCK-Zellen war das mehrschichtige Wachstum in Aufsicht weniger ersichtlich aufgrund ihrer kugelförmigen Gestalt im konfluenten Zustand (Abbildung 4.18 D).

Durch den Zusatz von Vitamin C zum Kultivierungsmedium kam es bei beiden Zellarten zur Ausbildung von zusammenhängenden Zellrasen, sogenannten Zellsheets, die im Ganzen von der Kultivierungsoberfläche abgelöst werden konnten und robust genug waren, der notwendigen Handhabung für weitere Untersuchungen wie Lichttransmission, Materialprüfung und Rasterelektronenmikroskopie standzuhalten. Bei den HCK-Zellen, die im Standardmedium F99 ohne Vitamin C-Zusatz kultiviert wurden, war ein Ablösen des gesamten Zellrasens nur bedingt möglich. Bei diesen Zellrasen kam es trotz sehr vorsichtiger Handhabung sehr leicht zum Einreißen. Deshalb waren sie für die obengenannten weiterführenden Untersuchungen nicht geeignet. Die HuFib-Zellen ohne Vitamin C-Zusatz bildeten keinen zusammenhängenden Zellrasen aus, sodass ein Ablösen nicht möglich war. Diese Beobachtungen deuteten bereits an, dass zum einen die Vitamin C-

Supplementierung zu einer gesteigerten Sekretion extrazellulärer Matrix geführt hatte und zum anderen, dass es Unterschiede gab hinsichtlich der extrazellulären Matrix bei den beiden Zellarten im jeweiligen Standardmedium ohne Vitamin C-Zusatz.

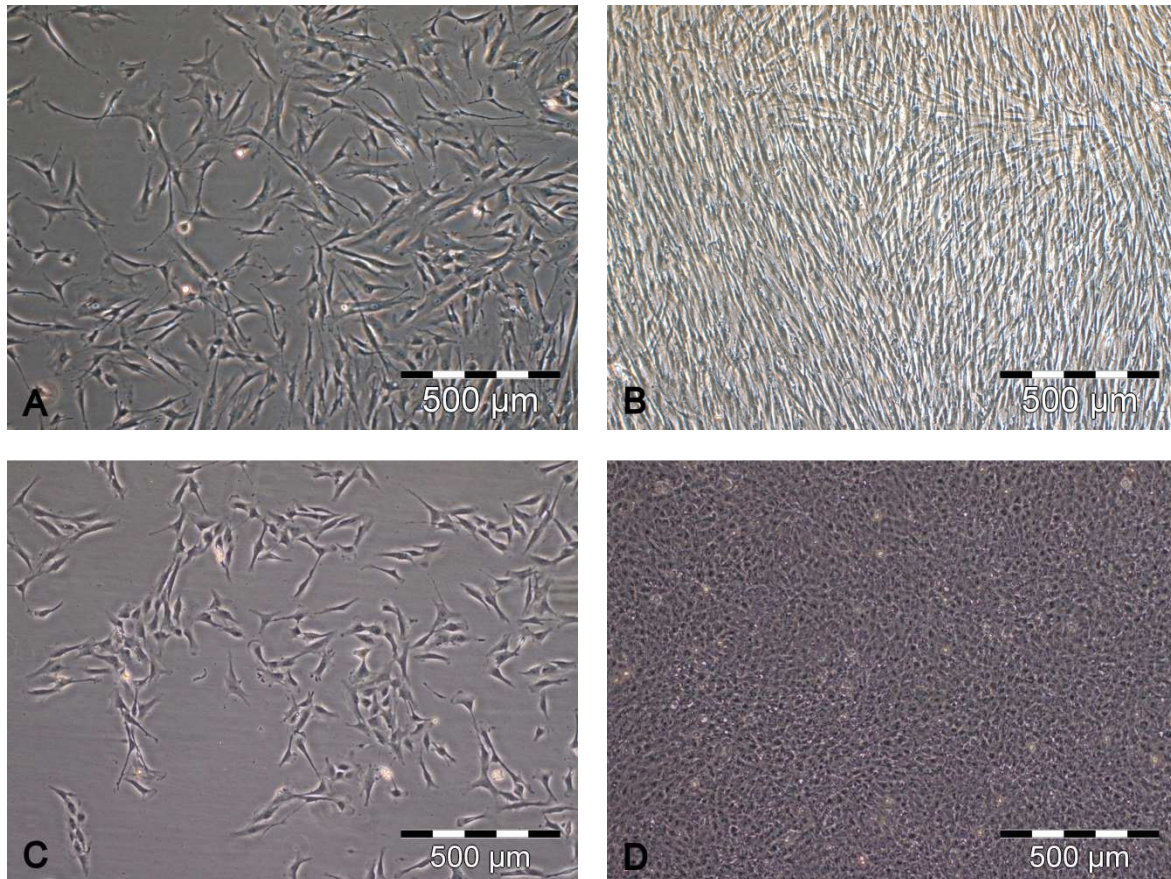


Abbildung 4.18: Lichtmikroskopische Darstellung mit Phasenkontrast von HuFib-Zellen (A, B) und HCK-Zellen (C, D); die Zellen sind jeweils im subkonfluenten (A, C) und im konfluenten, bereits mehrschichtigen Zustand (B und D) dargestellt; Messbalken 500 µm.

### 4.2.2 Zeitabhängige Untersuchungen an Langzeitkulturen stromaler Zellen

#### 4.2.2.1 Proliferationsuntersuchung

Für beide Zellarten, jeweils mit und ohne Vitamin C-Zusatz zum Kulturmedium, stieg die Zellzahl pro Well über den beobachteten Kultivierungszeitraum deutlich an (Abbildung 4.19 A). Bei den HuFib-Zellen primären Ursprungs verursachte die Zugabe von

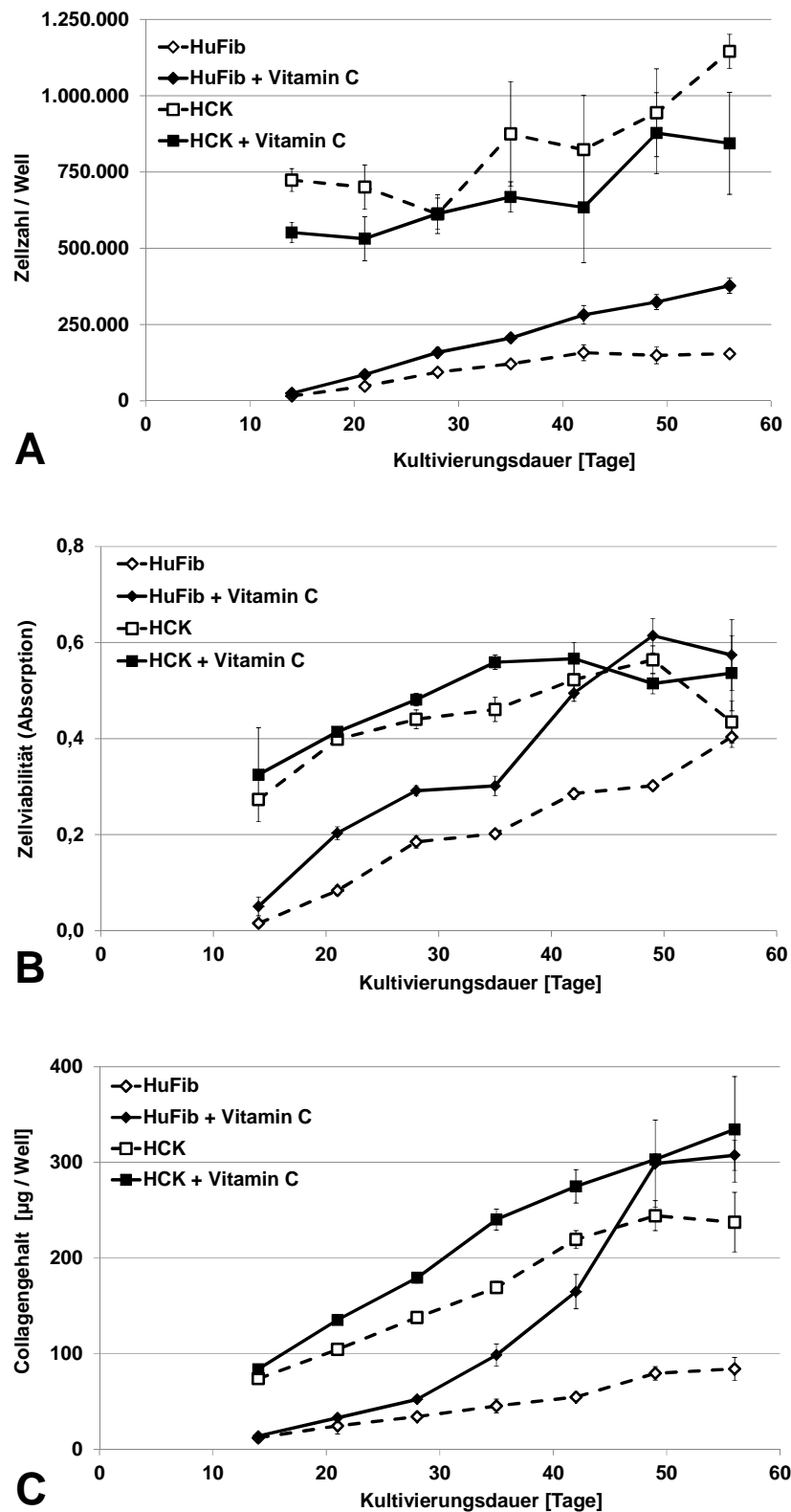


Abbildung 4.19: Einfluss der Vitamin C-Supplementierung auf die Zellproliferation (A), die Zellviabilität (B) und die Menge an synthetisiertem Collagen (C) in HuFib- und HCK-Zellkulturen in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer ( $\bar{x} \pm s.d.$ ;  $n=3-6$ ). In dieser Untersuchung wurden die Passagen 5-11 der HuFib-Zellen und die Passagen 33-39 der HCK-Zellen verwendet. Die Daten sind repräsentativ für insgesamt 8 Testreihen der HuFib-Zellen und 5 Testreihen der HCK-Zellen, die hinsichtlich der initialen Zellpassagen und der Kultivierungsdauer leicht variierten.



Vitamin C nach 56-tägiger Kultivierung eine Erhöhung der Zellzahl von etwa 150.000 Zellen/Well (DMEM) auf etwa 400.000 Zellen/Well (DMEM + Vitamin C). Der proliferationsfördernde Effekt von Vitamin C auf die HuFib-Zellen war statistisch signifikant ( $p < 0,02$ ) und zeigte sich bereits nach dreiwöchiger Kultivierung. Bei den immortalisierten HCK-Zellen konnte kein stimulierender Effekt auf die Zellproliferation festgestellt werden. Hier ergab sich nach der achtwöchigen Kultivierung eine Zellzahl im Bereich von 1.000.000 Zellen/Well für das Standardmedium mit oder ohne Vitamin C-Zugabe. Damit lag die Zellzahl in einem deutlich höheren Bereich als bei den HuFib-Zellen. Dieser Befund ist auf die Immortalisierung der HCK-Zellen zurückzuführen, die die hohe Proliferationsrate der Zelllinie bedingt. Die im Vergleich hohen Standardabweichungen der HCK-Messkurven, insbesondere mit zunehmender Kultivierungsdauer, sind der hohen Zellzahl und dem damit verbundenen sehr dichten Wachstumszustand der Kulturen geschuldet, die das für den Zählvorgang erforderliche Vereinzeln der Zellen erschwerten.

#### **4.2.2.2 Viabilitätsmessung**

Die Zellviabilität der Langzeitkulturen stieg zu Beginn der Kultivierung kontinuierlich an (Abbildung 4.19 B). Am Ende des beobachteten Kultivierungszeitraums deutete sich für die HuFib-Zellen mit Vitamin C-Zusatz und für die HCK-Zellen mit und ohne Zugabe des Supplements das Erreichen eines Plateaus an. Ebenso wie bei der Betrachtung der Zellproliferation zeigte sich für die HuFib-Zellen auch bei der Viabilitätsbestimmung ein stimulierender Effekt der Vitamin C-Supplementierung gegenüber dem Standardmedium, der ebenfalls statistisch signifikant war ( $p < 0,05$ ). Für die HCK-Zellen ergab sich auch hier kein signifikanter Unterschied der beiden Kultivierungsmedien.

#### **4.2.2.3 Collagengehalt**

Um die Menge synthetisierten Collagens in den Kulturen zu bestimmen, wurde die Picrosirius Red-Färbung eingesetzt, die von Junqueira et al. etabliert wurde [1979a]. Sirius

Red ist ein anionischer Farbstoff, der über seine Sulfonsäurestrukturen mit basischen Gruppen des Collagenmoleküls interagieren kann. Dabei kommt es zu einer parallelen Anlagerung des Farbstoffes an die Proteinkette [Junqueira et al., 1979b]. Dieser kolorimetrische Assay ist in der Lage, die Collagentypen I bis V nachzuweisen und ergibt für Collagen Typ I und Typ III eine kräftige, konzentrationsabhängige Farbreaktion [Junqueira et al., 1979a; Walsh et al., 1992]. Collagen Typ I ergibt dabei eine höhere Farbintensität [Tullberg-Reinert und Jundt, 1999].

Es konnte bei dieser Untersuchung festgestellt werden, dass die Deposition von Collagen durch die Vitamin C-Supplementierung unterstützt wurde (Abbildung 4.19 C). In den HuFib-Zellen war nach 28 Tagen eine statistisch höchstsignifikante ( $p < 0,0001$ ) Zunahme des Collagengehalts der Kulturen infolge des Vitamin C-Zusatzes im Vergleich zum Standardmedium messbar. Auch die HCK-Zelllinie reagierte mit einer statistisch signifikant ( $p < 0,005$ ) gesteigerten Synthese von Collagen auf die Supplementierung. In den immortalisierten Zellen war der stimulierende Effekt allerdings weniger stark ausgeprägt. Gegen Ende des betrachteten Kultivierungszeitraumes lag der Collagengehalt der HCK-Kulturen mit oder ohne Vitamin C-Zugabe und den HuFib-Zellen mit Vitamin C im Kulturmedium im gleichen Größenordnungsbereich, während der Gehalt bei den HuFib-Zellen im Standardmedium weniger als die Hälfte betrug.

Durch die Auswertung mehrerer Testreihen, wie sie exemplarisch in der Abbildung 4.19 dargestellt ist, konnte festgestellt werden, dass die Fähigkeit der HuFib-Zellen Collagen zu synthetisieren, merklich von der Anzahl der Zellpassagen, die die Zellen im Vorfeld der Messreihe durchlaufen hatten, beeinflusst wurde. Das Ansprechen der Kulturen auf die Vitamin C-Stimulation sank mit dem Anstieg der Zellpassage. Dieser Alterungseffekt der Kulturen ist in Abbildung 4.20 A dargestellt anhand von Zellen, die alle über einen Zeitraum von 42 Tagen kultiviert wurden, sich aber in ihrer Zellpassage unterschieden (Passagen 6-14). Während die Anzahl der Zellpassagen um die Zahl 8 anstieg, sank die Fähigkeit der HuFib-Zellen Collagen zu synthetisieren etwa um den Faktor 10. Im Vergleich dazu ergab sich bei den HCK-Zellen bei der Betrachtung eines Bereichs aus 30 Zellpassagen (Passagen

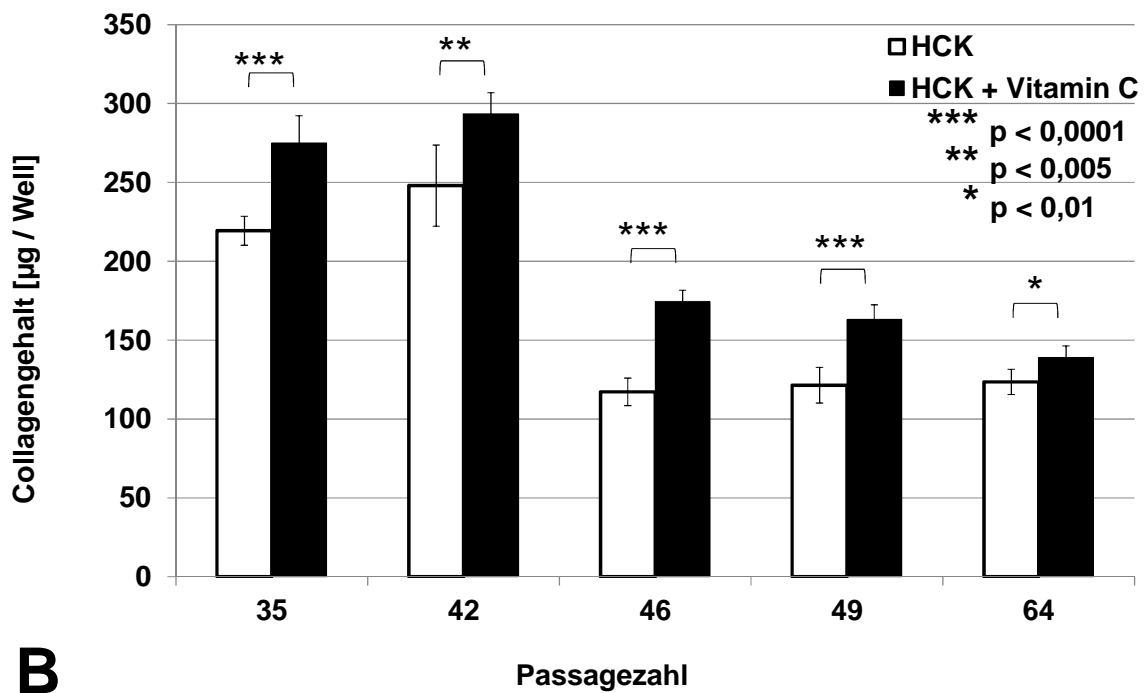
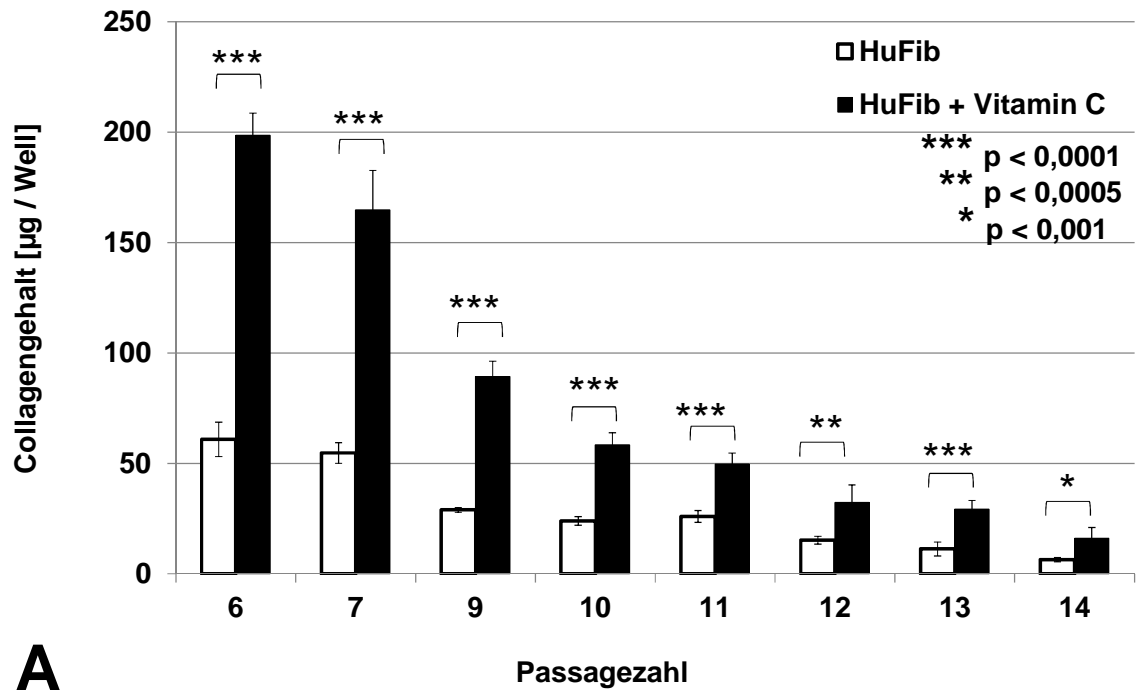


Abbildung 4.20: Collagengehalt von HuFib- (A) und HCK-Zellkulturen (B) bestimmt mittels Picrosirius Red-Färbung nach 42-tägiger Kultivierung und das Ansprechen der Kulturen auf die Vitamin C-Supplementierung in Abhängigkeit von der Zellpassage ( $\bar{x} \pm sd$ ;  $n=5-6$ ). Es wurden die Ergebnisse aus 8 Messreihen der HuFib-Zellen bzw. 5 Messreihen der HCK-Zellen berücksichtigt.

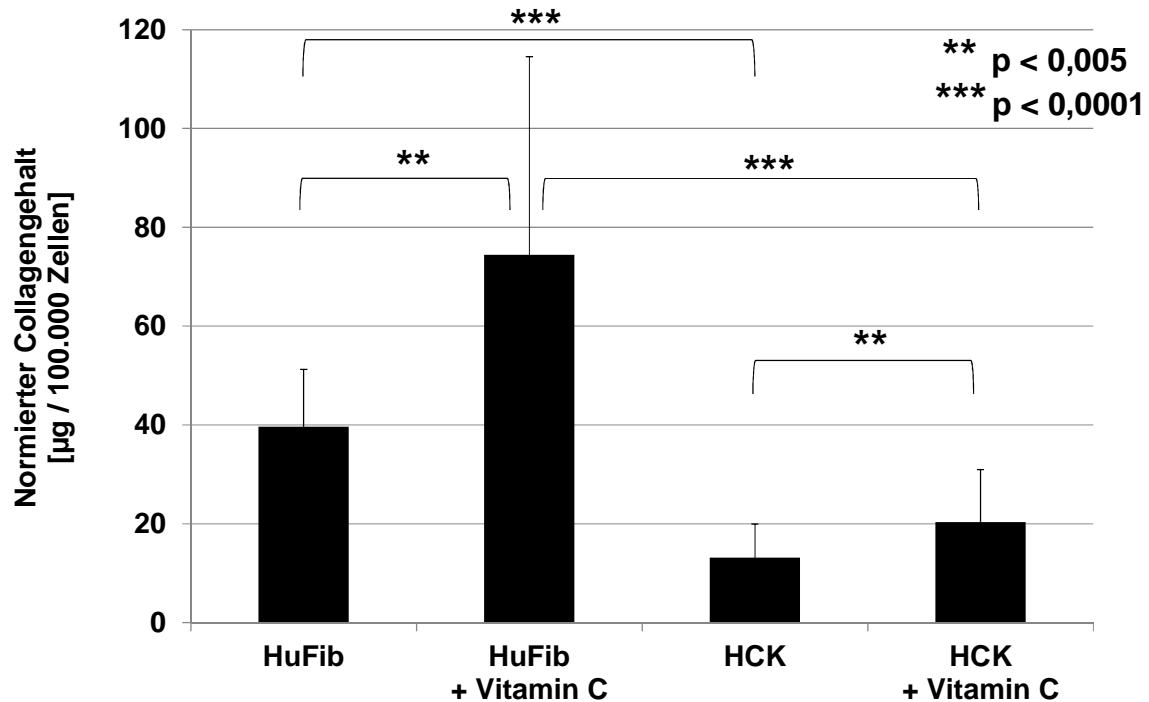


Abbildung 4.21: Mengen synthetisierten Collagens normiert auf 100.000 Zellen. Die Werte wurden anhand der ermittelten Mittelwerte von Collagengehalt und Zellzahl der verschiedenen Messreihen berechnet. Dabei wurden für die HuFib-Zellen Daten der Passagen 5-9 aus 8 Messreihen und für die HCK-Zellen Daten der Passagen 33-71 aus 5 Messreihen berücksichtigt ( $\bar{x} \pm sd$ ; n=15-36).

35-64) lediglich ein Absinken der Collagensynthesefähigkeit um den Faktor 2 (Abbildung 4.20 B).

Der in Abbildung 4.19 C dargestellte Collagengehalt ließ eine vergleichende Beurteilung der Collagensyntheseleistung der beiden Zellentypen nicht zu, aufgrund der doch sehr unterschiedlichen Zellzahlen in den Kulturen. Deshalb wurde eine Normierung des ermittelten Collagengehalts der Kulturen auf die Zellzahl vorgenommen, um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten (Abbildung 4.21). Wegen des zuvor beschriebenen Alterungseffektes wurden im Falle der HuFib-Zellen nur die Passagen 5-9 eingeschlossen, da in diesen die Fähigkeit zur Collagensynthese vergleichsweise gut ausgeprägt war. Für die HCK-Zellen konnte ein breiter Bereich an Zellpassagen (33-71) eingeschlossen werden, da

hier der Alterungsprozess deutlich geringer ausgeprägt war. In beiden Zelltypen induzierte die Vitamin C-Supplementierung eine statistisch signifikant ( $p < 0,005$ ) erhöhte Collagendeposition in den Kulturen. Der normierte Collagengehalt der HuFib-Zellkulturen mit oder ohne Vitamin C-Zusatz war dabei jeweils etwa um den Faktor 3 größer als der korrespondierende normierte Collagengehalt der HCK-Zellkulturen. Sowohl mit als auch ohne Vitamin C-Supplementierung war der Unterschied der Collagensyntheseleistung der beiden Zelltypen statistisch signifikant ( $p < 0,0001$ ).

#### **4.2.2.4 Glykosaminoglykangehalt**

Die sulfatierten Glykosaminoglykane aus den cornealen Proteoglykanen konnten mit dem Farbstoff Dimethylmethylenblau nachgewiesen werden, nachdem die Proteoglykan-Struktur durch die Protease Papain aufgeschlossen wurde. Bei Bindung an die negativ geladenen Glykosaminoglykane verschiebt der kationische Farbstoff sein Absorptionsmaximum von 656 nm auf 535 nm. Der dabei entstehende Komplex neigt allerdings innerhalb weniger Minuten zur Präzipitation [Farndale et al., 1982]. Daher war es zweckmäßig, die Detektion nicht direkt durch eine Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 535 nm durchzuführen, sondern nach einer definierten Inkubationszeit das entstandene Präzipitat abzutrennen und den Komplex im Säuren wieder zu lösen. Die Detektion des dann ungebundenen Farbstoffs erfolgte entsprechend bei einer Wellenlänge von 656 nm.

Um eine Normierung des gemessenen Glykosaminoglykangehalts vornehmen zu können, wurde, wie zuvor bei der Bestimmung des Collagengehalts, parallel die Zellzahl ermittelt. Um bei dieser Untersuchung im Vorfeld einen Einfluss der Zellpassage auf das Ergebnis auszuschließen, wurde in diesem Fall dieselbe Zellpassage dieser Untersuchungsmethode zu verschiedenen Messzeitpunkten im Abstand von 1-2 Wochen unterzogen.

Der Verlauf der Zellproliferationskurve zeigte ein ähnliches Ergebnis, wie zuvor im Zuge der Bestimmung der Collagensyntheseleistung der Zellen ermittelt wurde (Abbildung 4.22 A). Die HCK-Zellen erreichten während der 49-tägigen Kultivierungsperiode eine maximale

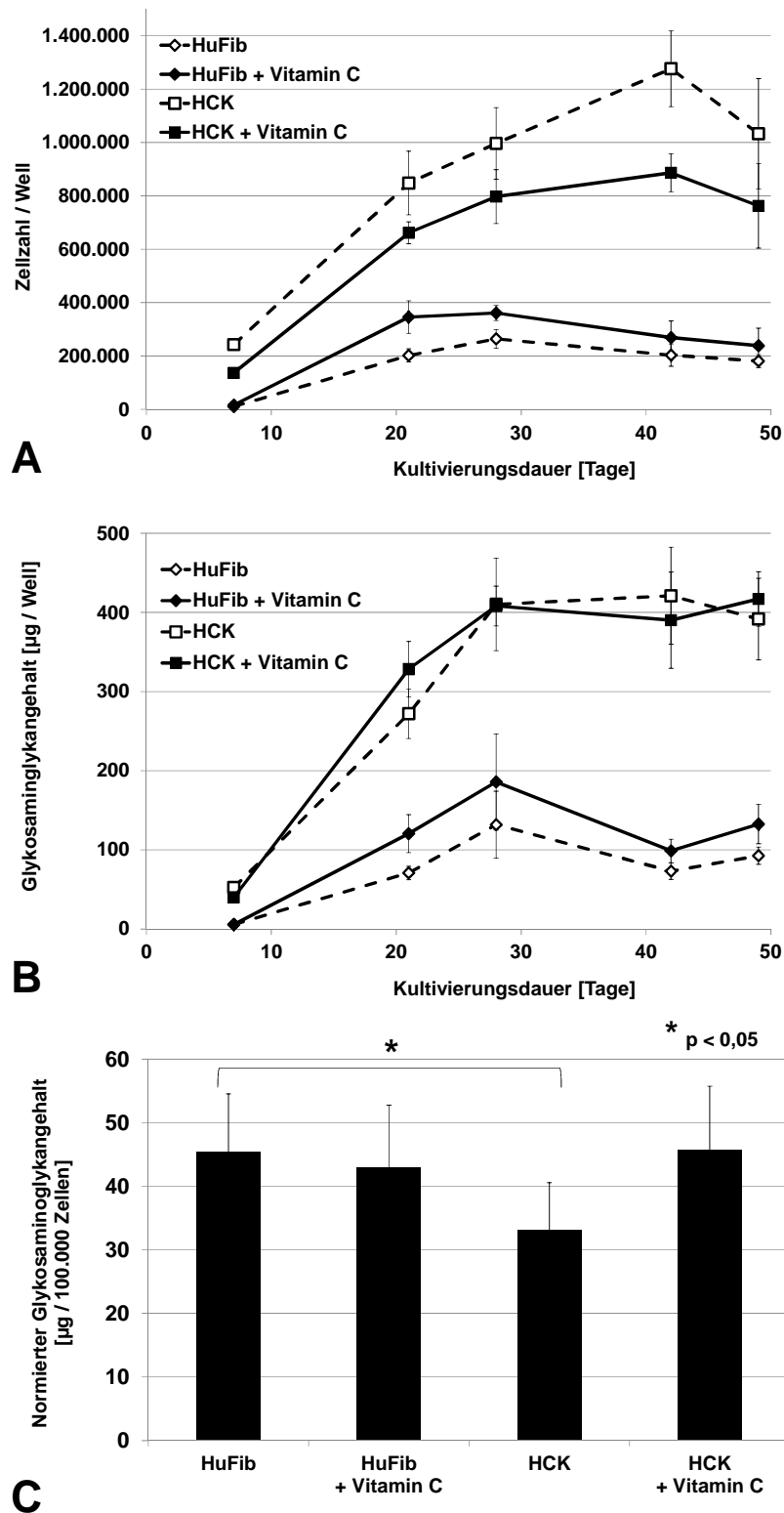


Abbildung 4.22: Einfluss der Vitamin C-Supplementierung auf die Zellproliferation (A) und den Glykosaminoglykangehalt (B) in HuFib- und HCK-Zellkulturen in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer ( $\bar{x} \pm sd$ ;  $n=6$ ). In dieser Untersuchung wurden die Passage 5 der HuFib-Zellen und die Passage 82 der HCK-Zellen verwendet. (C) Menge an synthetisierten Glykosaminoglykanen normiert auf 100.000 Zellen. Die Werte wurden anhand der ermittelten Mittelwerte von Glykosaminoglykangehalt und Zellzahl berechnet.

Zelldichte im Bereich von  $0,9-1,2 \times 10^6$  Zellen pro Well, wobei wiederum die HCK-Kurve ohne Vitamin C-Zusatz oberhalb der mit Vitamin C-Zusatz verlief. Für die HuFib-Zellen, die zwischenzeitlich eine Zellzahl von  $0,25-0,4 \times 10^6$  Zellen pro Well erreichten, konnte wieder ein leicht proliferationsfördernder Effekt für Vitamin C gemessen werden. Allerdings zeigte sich in diesem Messaufbau, der allein den Einfluss der Kultivierungsdauer ohne den Einfluss der Zellpassage berücksichtigte, dass die HuFib-Kulturen nach vierwöchiger bzw. die HCK-Zellen nach fünfwöchiger Kultivierung einen leichten Rückgang der Zellzahl pro Well zeigten. Die Betrachtung des Glykosaminoglykangehalts zeigte für alle Kulturen einen Anstieg bis zu einer Kultivierungsdauer von circa 4 Wochen und blieb danach annähernd konstant (Abbildung 4.22 B). Für die HCK-Zellen ergab sich eine Menge an Glykosaminoglykanen von etwa  $400 \mu\text{g/Well}$ , die unabhängig von der Vitamin C-Zugabe war. Im Falle der HuFib-Zellen war ein Glykosaminoglykangehalt im Bereich von  $100-150 \mu\text{g/Well}$  messbar, wobei der Gehalt für die Vitamin C-supplementierten Kulturen jeweils etwas größer war. Wie die Normierung des Glykosaminoglykangehalts allerdings zeigte, war dieser Effekt allein der in diesen Kulturen höheren Zellzahl geschuldet (Abbildung 4.22 C). Hierbei ergab sich bei beiden Zelltypen kein signifikanter Unterschied der Vitamin C-Zugabe im Vergleich zum jeweiligen Standardmedium. Es errechnete sich lediglich ein signifikanter Unterschied mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% hinsichtlich der Glykosaminoglykan-Syntheseleistung zwischen HuFib-Zellen und HCK-Zellen ohne Vitamin C-Zusatz, der sich allerdings in den mit Vitamin C-supplementierten Kulturen nicht wiederfinden ließ.

#### **4.2.2.5 Zusammenfassende Diskussion zu zeitabhängigen Untersuchungen an Langzeitkulturen stromaler Zellen**

Die Fähigkeit humaner cornealer stromaler Zellen, Collagen zu sezernieren und dieses in gewissem Maße zu organisieren, bleibt bei der In-vitro-Kultivierung erhalten und kann durch die Supplementierung mit Vitamin C stimuliert werden [Newsome et al., 1974; Stoesser et al., 1978; Ruggiero et al., 1996; Guo et al., 2007]. Wesentliche Bestandteile der Polypeptidstränge des Collagenmoleküls neben Glycin sind die Aminosäuren Prolin und

Hydroxyprolin. Vitamin C stellt einen essentiellen Co-Faktor für die Hydroxylierung von Prolin zu Hydroxyprolin dar. Dadurch wird die Ausbildung der tripelhelikalen Struktur des Collagens ermöglicht, die dem Molekül die nötige Stabilität verleiht [Levene und Bates, 1975; Galopp und Paz, 1975]. Des Weiteren fördert Vitamin C die Prozessierung von Procollagen zu Collagen und dessen extrazelluläre Deposition [Hata und Senoo, 1989; Levene und Bates, 1975]. Wenn Vitamin C nicht in ausreichendem Maße zur Verfügung steht, wird eine nicht hydroxylierte Form des Collagens gebildet, die infolge der beeinträchtigten Stabilität der Tripelhelix weniger widerstandsfähig gegenüber Degradation ist [Peterkofsky, 1972; Levene und Bates, 1975; Musselmann et al., 2006].

Es konnte bereits gezeigt werden, dass corneale stromale Zellen unter In-vitro-Bedingungen auch verschiedene Proteoglykane synthetisieren können [Hassel et al., 1992; Ren et al., 2008]. Die Synthese dieser Proteoglykane variiert dabei mit dem von den stromalen Zellen exprimierten Phänotyp, der wiederum von den Kultivierungsbedingungen beeinflusst wird (siehe Abschnitt 2.4.2). Das zur Gruppe der kleinen leucinreichen Proteoglykane gehörende Keratocan gilt als ein Marker für den in vivo unter normalen Bedingungen vorkommenden ruhenden Keratozyten-Phänotyp, der in vitro durch eine serumfreie Kultivierung erhalten werden kann [Funderburgh et al., 2003; Ruberti und Zieske, 2008; Du et al., 2007]. Im Fibroblasten- und Myofibroblasten-Phänotyp ist die Biosynthese von Keratansulfat sowie dessen Kettenlänge und Sulfatierung deutlich vermindert, während Vorkommen, Kettenlänge und Sulfatierung der Chondroitin/Dermatansulfat-Glykosaminoglykane gesteigert sind [Hassell et al., 1992; Funderburgh et al., 2003]. Diese Phänotypen bilden außerdem vermehrt das Proteoglykan Biglycan, das in fibrotischem cornealen Gewebe auftritt [Funderburgh et al., 2001; Funderburgh et al., 2003]. Zur Fähigkeit der immortalisierten HCK-Zelllinie Collagene und Proteoglykane zu synthetisieren sind bisher keine Daten in der Literatur verfügbar.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass der Zusatz von Vitamin C zum Kulturmedium die Zellviabilität der HuFib-Zellen steigerte und ihre Proliferation stimulierte. Dieser stimulierende Effekt wurde zuvor bereits für 3T6-Mäusefibroblasten und humane dermale Fibroblasten



beschrieben [Levene und Bates, 1975; Hata und Senoo, 1989]. Bei der immortalisierten HCK-Zelllinie war keine gesteigerte Zellproliferation infolge der Vitamin C-Supplementierung erkennbar. Insgesamt betrachtet zeigten die Bestimmung von Zellzahl und Zellviabilität eine gute Übereinstimmung. Die nicht vollständige Korrelation des Kurvenverlaufs von Zellproliferation und Zellviabilität gegen Ende der Kultivierungsperiode könnte darauf zurückgeführt werden, dass ab einer bestimmten Zellzahl das zur Verfügung stehende Mediumreservoir nicht mehr ausreichend war für die volle Stoffwechselleistung der einzelnen Zellen.

In den Vitamin C-supplementierten HuFib-Kulturen konnte eine deutliche Steigerung des Collagengehalt der Kulturen festgestellt werden im Vergleich zu den im Standardmedium DMEM ohne Vitamin C-Zusatz kultivierten Zellen, bei denen nur eine geringe Collagenmenge detektiert werden konnte. Im Falle der HCK-Zellen war bereits im Standardmedium F99 ein merklicher Collagengehalt feststellbar. Dies könnte darin begründet sein, dass das Medium F99, im Gegensatz zum Medium DMEM, bereits eine geringe Menge Vitamin C von etwa 25 ng/ml enthält. Die Supplementierung mit 50 µg/ml Vitamin C induzierte dennoch eine Erhöhung der synthetisierten Collagenmenge, wenngleich diese Steigerung geringer ausgeprägt war als in den HuFib-Zellen. Die ermittelten Werte für den Collagengehalt der HCK-Zellen und der HuFib-Zellen mit Vitamin C-Zusatz lagen in der gleichen Größenordnung. Durch die parallele Bestimmung der Zellzahl der Kulturen war eine Normierung des Collagengehalts auf die Zellzahl möglich, die eine differenzierte Betrachtung der Collagensyntheseleistung der Zellen ermöglichte. Diese zeigte, dass Vitamin C in beiden Zellarten die Collagensyntheseleistung steigerte, und dass die HuFib-Zellen den HCK-Zellen jeweils hinsichtlich dieser Fähigkeit überlegen waren. Die HCK-Zellen erwiesen sich allerdings als vorteilhaft bei der Betrachtung der Collagensynthesefähigkeit unterschiedlich alter Zellpassagen. Während sich bei den HuFib-Zellen nach wenigen Passagen ein deutlicher Alterungseffekt bemerkbar machte, konnten die HCK-Zellen ihre Fähigkeit zur Collagensynthese über einen breiten Passagebereich weitgehend aufrechterhalten.

Die Untersuchung des Glykosaminoglykangehalts zeigte, dass die mit Vitamin C stimulierten HuFib-Zellen einen leicht erhöhten Gehalt aufwiesen. Dieser Effekt wurde allerdings durch die Normierung auf die Zellzahl nivelliert, da die Zellzahl infolge der Vitamin C-Zugabe gleichermaßen erhöht war. Der Glykosaminoglykangehalt der HCK-Kulturen wurde durch die Vitamin C-Supplementierung nicht beeinflusst. Zwar wurde bei den HCK-Zellen ohne den Zusatz von Vitamin C eine höhere Zellzahl in den Kulturen erreicht, dies ergab aber bei der Normierung des Glykosaminoglykangehalt auf die Zellzahl keinen signifikanten Unterschied. Insgesamt betrachtet legt dieses Ergebnis nahe, dass die Synthese von Glykosaminoglykanen, im Gegensatz zu der von Collagen, nicht durch den Zusatz von Vitamin C zum Kulturmedium induziert wurde. Dieser Befund ist insofern nicht überraschend, da dem Vitamin keine entscheidende Rolle im Stoffwechselweg der Proteoglykane zukommt, wie es bei der Synthese von Collagen der Fall ist. Allerdings wäre es auch denkbar, dass Vitamin C auf indirektem Wege Einfluss auf den Gehalt der Proteoglykane nehmen könnte, indem durch das gesteigerte Vorkommen von Collagen in den Kulturen, die Synthese der Proteoglykane angeregt worden wäre, um zu deren geordneter Struktur beizutragen. Wie die Ergebnisse der Untersuchung des Glykosaminoglykangehalts aber zeigen, scheint die Menge an synthetisierten Proteoglykanen lediglich eine Korrelation zur Zellzahl aufzuweisen, da die normierten Werte in einem sehr ähnlichen Größenbereich lagen. Musselmann et al. konnten an bovinen cornealen Keratozyten, die über 4 Tage serumfrei kultiviert wurden, für Vitamin C-Zusatz eine Akkumulation des Proteoglykans Keratocan im Zellkulturmedium feststellen [2006]. Für die kombinierte Supplementierung mit Insulin und Vitamin C wurden eine Erhöhung der Collagenmenge und eine gesteigerte Akkumulation der Proteoglykane Keratocan und Lumican im Zellkulturmedium gefunden. Dieses Ergebnis wurde so gedeutet, dass Insulin die Collagensynthese im Zellinnern stimuliert und Vitamin C durch die Hydroxylierung des Procollagens die Bildung der Tripelhelix des Moleküls im endoplasmatischen Retikulum der Zellen fördert, sodass die sekretierte Menge an Collagen ansteigt, was wiederum die Proteoglykane stabilisiert, die mit der Tripelhelix interagieren können. Die Expression von Proteoglykanen in cornealen Keratozyten kann auch durch die

Wachstumsfaktoren IGF-1, FGF-2, PDGF und TGF- $\beta$ 1 gesteigert werden [Etheredge et al., 2009].

#### **4.2.3 Untersuchungen zum Nachweis von Collagentypen**

##### **4.2.3.1 Gelelektrophoretische Untersuchung**

Bei der gelelektrophoretischen Untersuchung wurde jeweils die gleiche Gesamtproteinmenge in die Taschen des Gels eingebracht, sodass durch den Vergleich der Intensitäten der Banden auf den Anteil von Collagen in den Proben geschlossen werden konnte. Die  $\alpha$ -Banden des Collagen Typ I-Moleküls waren für alle Proben sichtbar, wenngleich sie schwach ausgeprägt waren in den Proben der HCK-Zellen und der HuFib-Zellen ohne Vitamin C-Zusatz (Abbildung 4.23). Die Monomer-Banden waren deutlich ausgeprägt in den Proben der HuFib-Zellen mit Vitamin C-Supplementierung (Bahnen 3 und 7). In diesen Proben sind auch die Proteinfragmente höheren Molekulargewichts bei etwa 260 kDa und darüber erkennbar, die den Dimer- und der Trimer-Bande des Collagens Typ I zugeordnet werden können. In den Proben der HCK-Zellen mit oder ohne Vitamin C-Zusatz trat neben den  $\alpha$ -Banden eine Fraktion niedermolekularer Proteine auf (Bahnen 2, 4, 6 und 8; in der Abbildung 4.23 mit einem Stern markiert). Ein Vergleich der bei Raumtemperatur belassenen Proben mit den erhitzten Proben zeigte, dass die Hitzedenaturierung zu einer schärferen Bandentrennung führte, wenngleich die Intensität der höhermolekularen Banden infolge von Hydrolyseprozessen unter diesen Bedingungen merklich abnahm.

Das Ergebnis der Elektrophorese ließ keine Aussage zu, ob neben Collagen Typ I auch Collagen Typ III vertreten war. Collagen Typ III ist aus drei identischen  $\alpha$ 1-Ketten aufgebaut, die eine molare Masse von je 95-100 kDa aufweisen und im Gegensatz zu anderen Collagentypen durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind [Deyl und Adam, 1989]. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen wandert das Molekül deshalb vornehmlich als Trimer. Bei reduktiver Spaltung der Disulfidbrücken werden die monomeren  $\alpha$ 1-Ketten

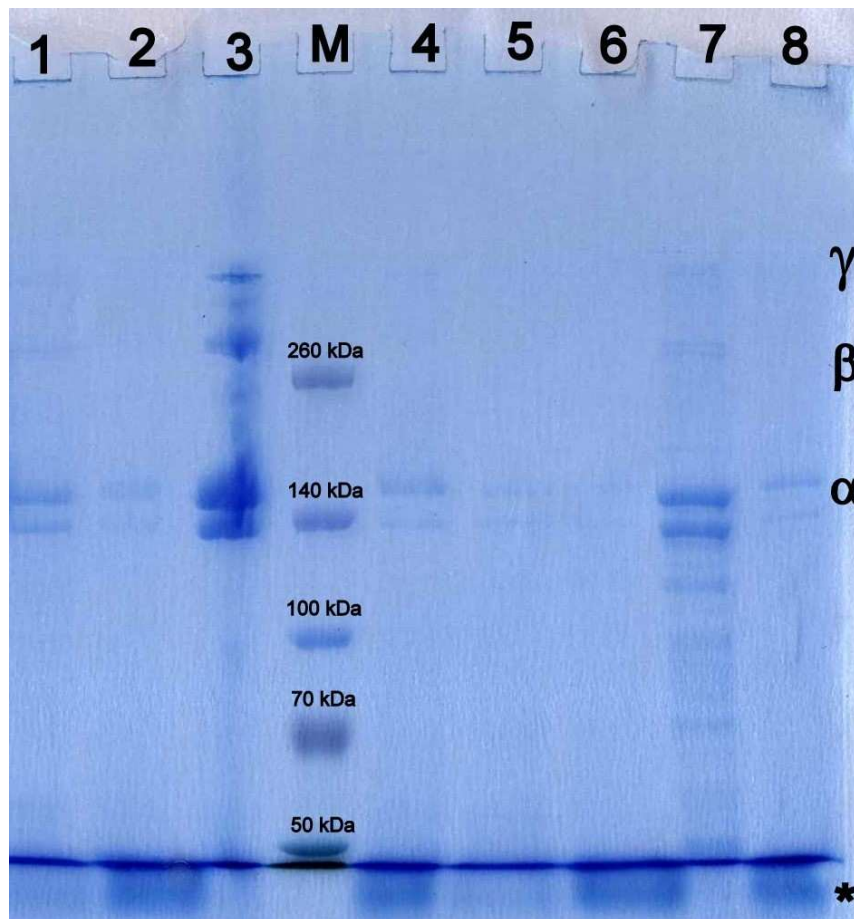


Abbildung 4.23: SDS-PAGE von HuFib-Zellen (1 und 5), HCK-Zellen (2 und 6), HuFib-Zellen mit Vitamin C-Supplementierung (3 und 7) und HCK-Zellen mit Vitamin C-Supplementierung (4 und 8) nach sechswöchiger Kultivierung. Die bei Raumtemperatur belassenen Proben befinden sich in den Bahnen 1-4 und die hitzedenaturierten Proben in den Bahnen 5-8. Die in allen Proben sichtbaren  $\alpha$ -Banden des Collagenmoleküls zeigen ein Molekulargewicht von etwa 140 kDa. In den HuFib-Zellen mit Vitamin C-Supplementierung sind zusätzlich die höhermolekularen  $\beta$ -Dimerbanden (etwa 260 kDa) erkennbar. Der Stern (\*) markiert die niedermolekularen Proteine in den Proben der HCK-Zellen.

freigesetzt, die geringfügig langsamer wandern als die  $\alpha$ 1-Ketten des Collagens Typ I. Bei humanen Collagenen ist die Wanderungstrecke der  $\alpha$ 1-Ketten von Collagen Typ I und Typ III so ähnlich, dass eine gute Auflösung der Banden schwierig ist [Sykes et al., 1976]. Eine Differenzierung der Banden hätte erzielt werden können, indem die Spaltung der Disulfidbrücken während der elektrophoretischen Trennung durchgeführt worden wäre mit

reduzierenden Agenzien wie Mercaptoethanol oder Thioglykolsäure [Sykes et al., 1976; Nakamura et al., 1989]. Allerdings ist anzunehmen, dass Collagen Typ III in einem deutlich geringeren Maße auftreten würde als Collagen Typ I und dass daher, aufgrund des zumeist geringen Collagengehalts der Proben, prägnante Banden nicht zu erwarten gewesen wären.

#### 4.2.3.2 Western Blot

Die gelelektrophoretische Trennung im Vorfeld des Western Blot-Experimentes zeigte ein ähnliches Ergebnis wie die zuvor durchgeführte SDS-PAGE mit gleichem Gesamtproteingehalt der Proben. Die HuFib-Zellen mit Vitamin C-Zusatz im Kulturmedium zeigten wieder ausgeprägte Collagenbanden, während der Einsatz des Zellmaterials aus einer Kulturflasche für die HuFib-Zellen im Standardmedium DMEM ohne Vitamin C-Zusatz keine erkennbaren Banden erzeugte (Abbildung 4.24 A). Im Falle der HCK-Zellen konnte in diesem Experiment durch den im Vergleich zu den HuFib-Zellen erhöhten Einsatz an Zellmaterial eine Verbesserung der Sichtbarkeit der Collagenbanden gegenüber der zuvor durchgeführten SDS-PAGE bei gleichem Gesamtproteingehalt der Proben erzielt werden (Abbildung 4.24 B).

Im Western Blot-Experiment zum Nachweis von Collagen Typ I ergaben sich im Falle der HuFib-Zellen mit Vitamin C-Supplementierung ausgeprägte Banden (Abbildung 4.24 C). Der Vergleich mit dem coomassiegefärbten Elektrophoresegele (Abbildung 4.24 A) zeigte gut erkennbar, dass der Antikörper selektiv die  $\alpha 2$ -Untereinheit des Collagen Typ I gebunden hatte. Zusätzlich erfolgte eine Bindung des Antikörpers an das zugehörige Dimer bei einer Laufhöhe von etwa 260 kDa. Aufgrund der niedrigen Proteinkonzentration der Probe aus HuFib-Zellen ohne Vitamin C-Zugabe waren auch im Western Blot keine Banden erkennbar. Für die HCK-Zellen wies der Blot sowohl mit als auch ohne Vitamin C-Supplementierung definierte Banden auf der Laufhöhe der  $\alpha 2$ -Untereinheit des Collagen Typ I auf (Abbildung 4.24 D). Somit konnte auch in diesen Proben die Gegenwart des Proteins nachgewiesen werden. Für beiden Zellarten waren zusätzlich Signale bei kleinerem

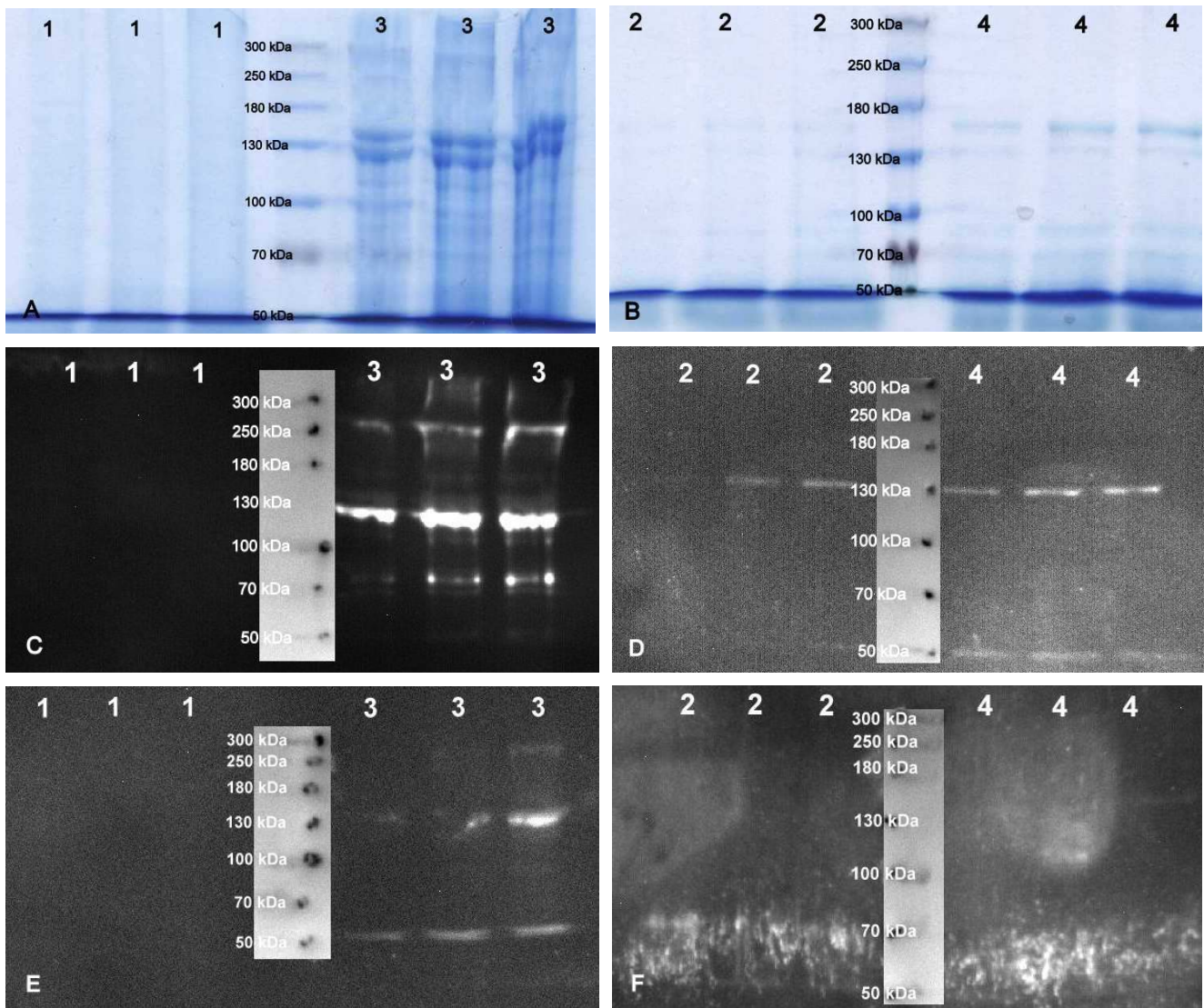


Abbildung 4.24: SDS-PAGE mit nachfolgender Western Blot-Untersuchung zum Nachweis von Collagen Typ I und Typ III in HuFib-Zellen (1), HCK-Zellen (2), HuFib-Zellen mit Vitamin C-Supplementierung (3) und HCK-Zellen mit Vitamin C-Supplementierung (4) nach sechswöchiger Kultivierung. Es wurden jeweils drei verschiedene Probenvolumina (10  $\mu$ l, 15  $\mu$ l, 20  $\mu$ l) aufgetragen. (A) SDS-PAGE der Proben der HuFib-Zellen; (B) SDS-PAGE der Proben der HCK-Zellen; (C) Detektion von Collagen Typ I in Proben der HuFib-Zellen; (D) Detektion von Collagen Typ I in Proben der HCK-Zellen; (E) Detektion von Collagen Typ III in Proben der HuFib-Zellen; (F) Detektion von Collagen Typ III in Proben der HCK-Zellen.

Molekulargewicht erkennbar, die vermutlich auf einen hydrolytischen Abbauprozess des Proteins infolge der Probenpräparation zurückgeführt werden können. Die Detektion von Collagen Typ III ergab im Falle der HuFib-Zellen mit Vitamin C-Zusatz Banden, die aufgrund ihrer Laufstrecke den monomeren  $\alpha 1$ -Untereinheiten des nachzuweisenden Proteins zugeordnet werden konnten (Abbildung 4.24 E). Auch hier ergab sich ein zusätzliches Signal bei einer kleineren Molekülgröße. Insgesamt war das Lumineszenzsignal im Vergleich zum Nachweis von Collagen Typ I schwächer ausgeprägt, was auf den vergleichsweise geringeren Gehalt dieses Proteins in der Probe hindeutete. Für die HCK-Zellen mit oder ohne Vitamin C-Zugabe konnte die Gegenwart von Collagen Typ III über das Western Blot-Experiment trotz des erhöhten Zellmaterialeinsatzes nicht nachgewiesen werden (Abbildung 4.24 F).

#### **4.2.3.3 Immunfluoreszenz**

Mittels Immunfluoreszenzfärbung konnte das Vorhandensein von Collagen Typ I in allen untersuchten Proben nachgewiesen werden. Bereits nach einwöchiger Kultivierungszeit zeigten die HuFib- und HCK-Zellen jeweils sowohl mit als auch ohne Vitamin C-Zusatz zum Standardmedium eine grüne Fluoreszenz, die das gesuchte Protein anzeigte (Abbildung 4.25 A-D). Nach zusätzlichen zwei Wochen Kultivierungsdauer, innerhalb derer die Zellen Konfluenz erreicht hatten, war die Fluoreszenz über eine noch größere Fläche ausgeprägt (Abbildung 4.25 E-H). Während bei den HuFib-Zellen ohne Vitamin C-Zusatz die zelluläre Struktur weiterhin erkennbar war, waren im Falle der Vitamin C-supplementierten Proben die Zellumrisse kaum noch sichtbar, was auf eine ausgeprägte extrazelluläre Deposition des Collagens Typ I hindeutete (Abbildung 4.25 E und F). Die Färbung ließ außerdem eine Längsorientierung erkennen. In den Proben der HCK-Zellen war aufgrund des sehr dichten Wachstums dieser immortalisierten Zelllinie eine Beurteilung der Lokalisation des Collagens nicht möglich (Abbildung 4.25 G und H).



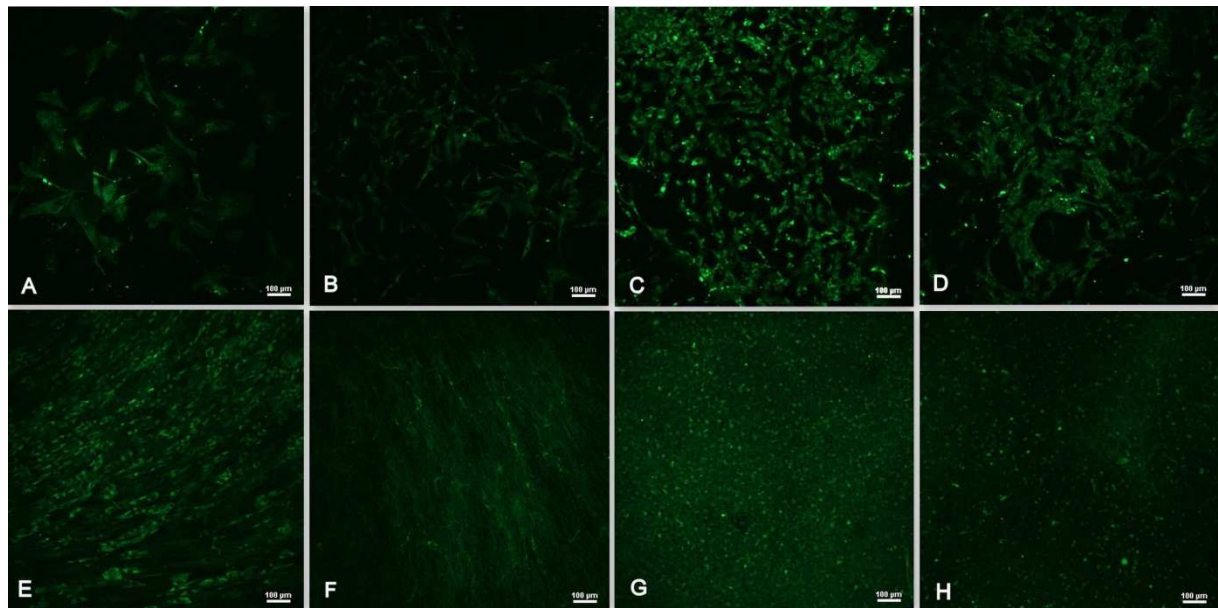


Abbildung 4.25: Konfokalmikroskopische Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbung von Collagen Typ I nach einer Kultivierungszeit von 1 (A-D) bzw. 3 Wochen (E-H); (A und E) HuFib-Zellen ohne Vitamin C-Zusatz; (B und F) HuFib-Zellen mit Vitamin C-Zusatz; (C und G) HCK-Zellen ohne Vitamin C-Zusatz; (D und H) HCK-Zellen mit Vitamin C-Zusatz; Messbalken 100 µm.

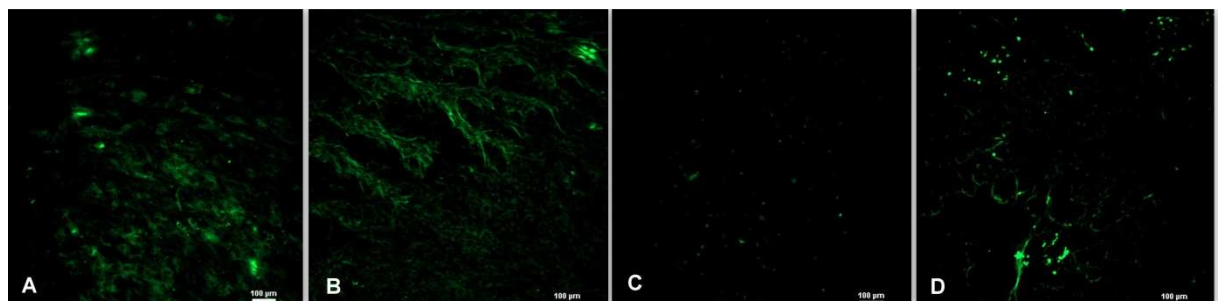


Abbildung 4.26: Konfokalmikroskopische Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbung von Collagen Typ III nach einer Kultivierungszeit von 3 Wochen; (A) HuFib-Zellen ohne Vitamin C-Zusatz; (B) HuFib-Zellen mit Vitamin C-Zusatz; (C) HCK-Zellen ohne Vitamin C-Zusatz; (D) HCK-Zellen mit Vitamin C-Zusatz; Messbalken 100 µm.



Die Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis von Collagen Typ III lieferte nur für die HuFib-Zellen mit und ohne Vitamin C-Zusatz einen eindeutig positiven Befund, wenngleich die Lokalisation im Vergleich zu Collagen Typ I diffuser erschien (Abbildung 4.26 A und B). Im Gegensatz dazu ergaben die HCK-Zellen ohne Vitamin C-Zusatz keinerlei Fluoreszenz bzw. die HCK-Zellen mit Vitamin C-Supplementierung nur vereinzelt lokal eine Färbung, sodass in diesem Falle kein eindeutiger Nachweis von Collagen Typ III möglich war (Abbildung 4.26 C und D).

#### **4.2.3.4 Zusammenfassende Diskussion zum Nachweis von Collagentypen**

Collagene werden entsprechend ihrer strukturellen Eigenschaften in verschiedene Klassen eingeteilt. Für corneales Stromagewebe wurde das Vorkommen von Collagen Typ I, III, V, VI, XII und XIV beschrieben [Schmut, 1978; Birk et al., 1986; Oh et al., 1993; Meek, 2008; Dyrland et al., 2012]. Während die Typen I, III und V zu den fibrillären Collagenen zählen, ist der Typ VI ein perlenschnurartiges Collagen. Collagen Typ XII und Typ XIV werden zu den fibrillenassoziierten Collagenen gezählt [Deyl und Miksik, 2000]. Es herrscht Konsens darüber, dass Collagen Typ I der in der Cornea dominierende ist. Die quantitativen Werte zum Vorkommen von Typ I variieren allerdings erheblich. Angaben bezüglich des mengenmäßigen Vorkommens der anderen Collagentypen sind seltener zu finden und teils widersprüchlich. So beschreiben Radda et al., dass in der humanen Cornea 85% Typ I, weniger als 10% Typ III und 5% Typ V vorliegen [1982]. Meek postuliert für das corneale Stroma eine Zusammensetzung von 58% Typ I, 24% Typ VI, 15% Typ V und geringeren Anteilen der Typen XII und XIV [2008]. Gemäß einer neueren Studie, die das Proteom der Schichten der humanen Cornea analysiert hat, kann für das Vorkommen der verschiedenen Collagene im Stroma eine quantitative Reihung von Typ I > Typ VI > Typ V ≈ Typ XII > Typ III abgeleitet werden [Dyrland et al., 2012]. Insbesondere bezüglich des Vorkommens von Collagen Typ III in humanem cornealen Stroma existieren divergierende Ergebnisse [Cintron et al., 1988; Ruggiero et al., 1996; Meek, 2008]. Höchstplausibel erscheint, dass Collagen Typ III in humanem Stroma, im Gegensatz zu einigen anderen Spezies, nur während der

neonatalen Entwicklung und in adultem Stroma während der Wundheilung auftritt, es aber in adultem gesunden Stromagewebe nicht zugegen ist [Cintron et al., 1988; Cintron und Hong, 1988; Funderburgh et al., 2003; Rieck et al., 2003; Rieck und Pleyer, 2003; Etheredge et al., 2009; Karamichos et al., 2010]. Möglicherweise hat das durch Disulfidbrücken verbundene Collagen Typ III die Funktion, das sich neubildende Gewebe initial zu stabilisieren [Cintron et al., 1988]. Entsprechend den Gegebenheiten in vivo bei der Wundheilung konnte auch bei der In-vitro-Kultivierung von humanen stromalen Zellen, die durch den Zusatz von Serum oder definierten Supplementen den Fibroblasten- oder Myofibroblasten-Phänotyp exprimierten, die Bildung von Collagen Typ III neben der von Typ I nachgewiesen werden [Cintron et al., 1988; Funderburgh et al., 2003; Karamichos et al., 2010]. Da in der vorliegenden Studie die Kultivierung unter serumhaltigen Bedingungen erfolgt ist, wurden die Kulturen auf das Vorhandensein dieser beiden Collagentypen hin untersucht.

Die Elektrophorese mit gleichem Gesamtproteingehalt der Proben (Abbildung 4.23) zeigte deutlich, dass bei den HuFib-Zellen mit Vitamin C-Supplementierung im Vergleich zu den anderen Proben ein sehr viel größerer Anteil des Gesamtproteingehalts auf Collagen fiel. Das Vorkommen der ausgeprägten niedermolekularen Banden bei den HCK-Zellen kann durch die in diesen Kulturen deutlich höhere Zellzahl erklärt werden. Der Vergleich der Intensitäten der Collagenbanden der Proben bei dieser Elektrophorese und der zuvor ermittelte normierte Collagengehalt (Abbildung 4.21) ergaben die gleiche Abstufung der beiden Zellarten und den jeweiligen Kultivierungsbedingungen: HuFib-Zellen mit Vitamin C-Zusatz zeigten unter diesen normierten Bedingungen den höchsten Collagengehalt, gefolgt von den HuFib-Zellen ohne Vitamin C-Zusatz und den HCK-Zellen mit Vitamin C-Zusatz, die wiederum einen höheren Collagengehalt aufwiesen als die HCK-Zellen ohne Vitamin C-Supplementierung. Die Ergebnisse dieser beiden Untersuchungen ergaben demnach eine sehr gute Korrelation.

Der Versuch, die collagenen Bestandteile der extrazellulären Matrix mittels SDS-PAGE und Western Blot zu detektieren und zu identifizieren, wurde insofern erschwert, als dass

polymerisierte fibrillenformende Collagene eine schlechte Löslichkeit aufweisen, sodass das Lösen der Collagene aus den Zellrasen bei der Probenpräparation nur recht unvollständig erfolgte [Deyl und Miksik, 2000]. Dies hatte zur Folge, dass sich für einige Proben nur sehr schwache bzw. keine erkennbaren Banden ergaben. Durch den insgesamt niedrigen Anteil gelösten Collagens wurde außerdem der Nachweis des in geringem Ausmaß vertretenen Typ III neben dem dominierenden Typ I erschwert.

Die Immunfluoreszenzuntersuchungen und die Western Blot-Analytik ergaben übereinstimmende Ergebnisse hinsichtlich des Vorhandenseins der untersuchten Collagentypen. Collagen Typ I konnte mit großer Bestimmtheit in beiden Zellarten nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte mit beiden analytischen Methoden das Auftreten von Collagen Typ III in den HuFib-Zellkulturen detektiert werden. Hinsichtlich der Synthese von Collagen Typ III durch die HCK-Zellen ergab sich bei der Western Blot-Analytik kein positiver Befund, und die Immunfluoreszenzuntersuchung wies nur für die Vitamin C-supplementierten HCK-Zellkulturen eine geringfügige Fluoreszenz auf. Insgesamt betrachtet, legen diese Ergebnisse nahe, dass die Synthese von Collagen Typ III in den HCK-Zellen nicht bzw. nur in einem sehr geringeren Maße stattfand. Auch diese Erkenntnis kann dahingehend interpretiert werden, dass in den HCK-Zellen bei der Immortalisierung der Keratozyten-Phänotyp weitgehend erhalten wurde.

#### **4.2.4 Untersuchungen an Zellsheets**

##### **4.2.4.1 Lichttransmission**

Bereits bei makroskopischer Betrachtung der Zellsheets zeigten sich deutliche Unterschiede der beiden Zellarten hinsichtlich ihrer optischen Eigenschaften. Die HuFib-Zellsheets zeichneten sich durch eine hohe Transparenz aus, die anhand der in Abbildung 4.27 A dargestellten Betrachtung des Buchstaben A durch das Zellsheet hindurch gut erkennbar war. Vergleichend dazu wiesen die HCK-Zellsheets eine leichte Trübung auf (Abbildung 4.27 B).

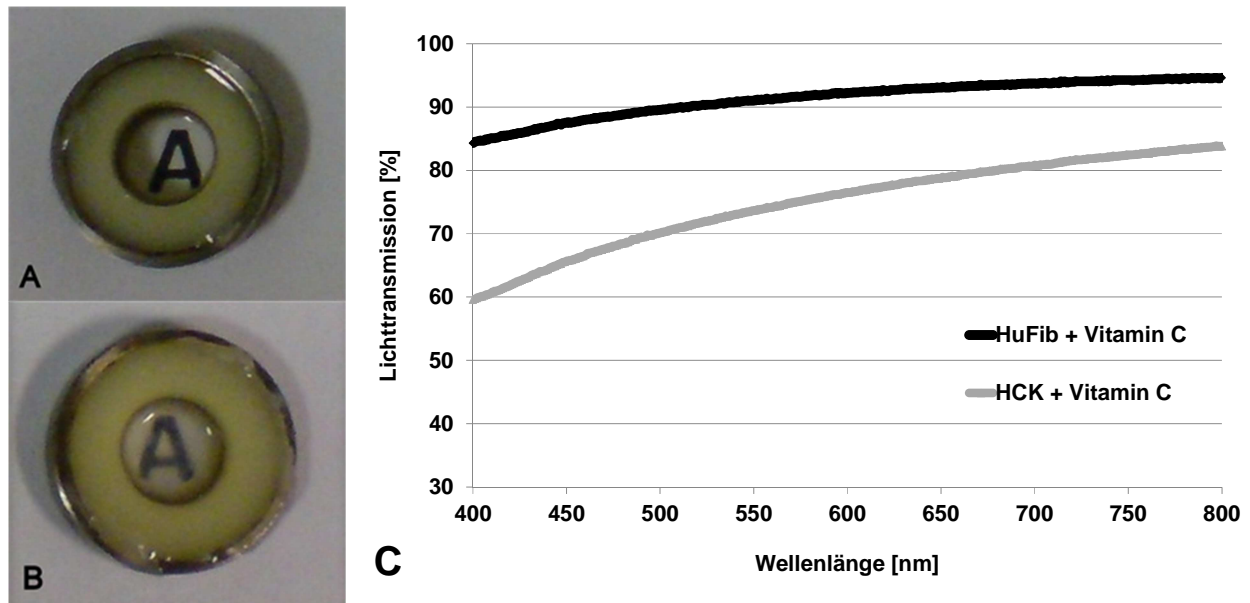


Abbildung 4.27: Transparenz der HuFib- (A) und HCK-Zellsheets (B) in makroskopischer Betrachtung sowie die Bestimmung der Lichttransmission ( $\bar{x}$  ;  $n=3$ ) im Wellenlängenbereich von 400-800 nm (C).

Die Bestimmung der Lichttransmission, die über die Aufnahmen eines Absorptionsspektrums im Wellenlängenbereich von 400-800 nm erfolgte, bestätigte die makroskopische Beurteilung der Zellsheets (Abbildung 4.27 C). Die HuFib-Zellsheets zeigten bei einer Wellenlänge von 400 nm eine Lichttransmission von 85%. Mit steigender Wellenlänge nahmen die Werte der Lichttransmission bis auf etwa 95% zu. Im Gegensatz dazu hatten die HCK-Zellsheets bei einer Wellenlänge von 400 nm lediglich eine Lichttransmission von 60%, die sich bei Anstieg der Wellenlänge auch nur auf etwa 85% erhöhte.

#### 4.2.4.2 Rasterelektronenmikroskopie

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten, dass die Zellsheets eine glatte Oberfläche aufwiesen (Abbildungen 4.28 A und B). Infolge der Probenpräparation entstanden Brüche in den Oberflächen, die einen Einblick in das Innere der Zellsheets ermöglichten. Sowohl die HCK- als auch die HuFib-Zellsheets wiesen deutlich erkennbare fibrilläre Strukturen mit einem Durchmesser von circa 50 nm auf. Diese fibrillären, teilweise parallel zueinander ausgerichteten Strukturen waren den Collagenfibrillen der extrazellulären

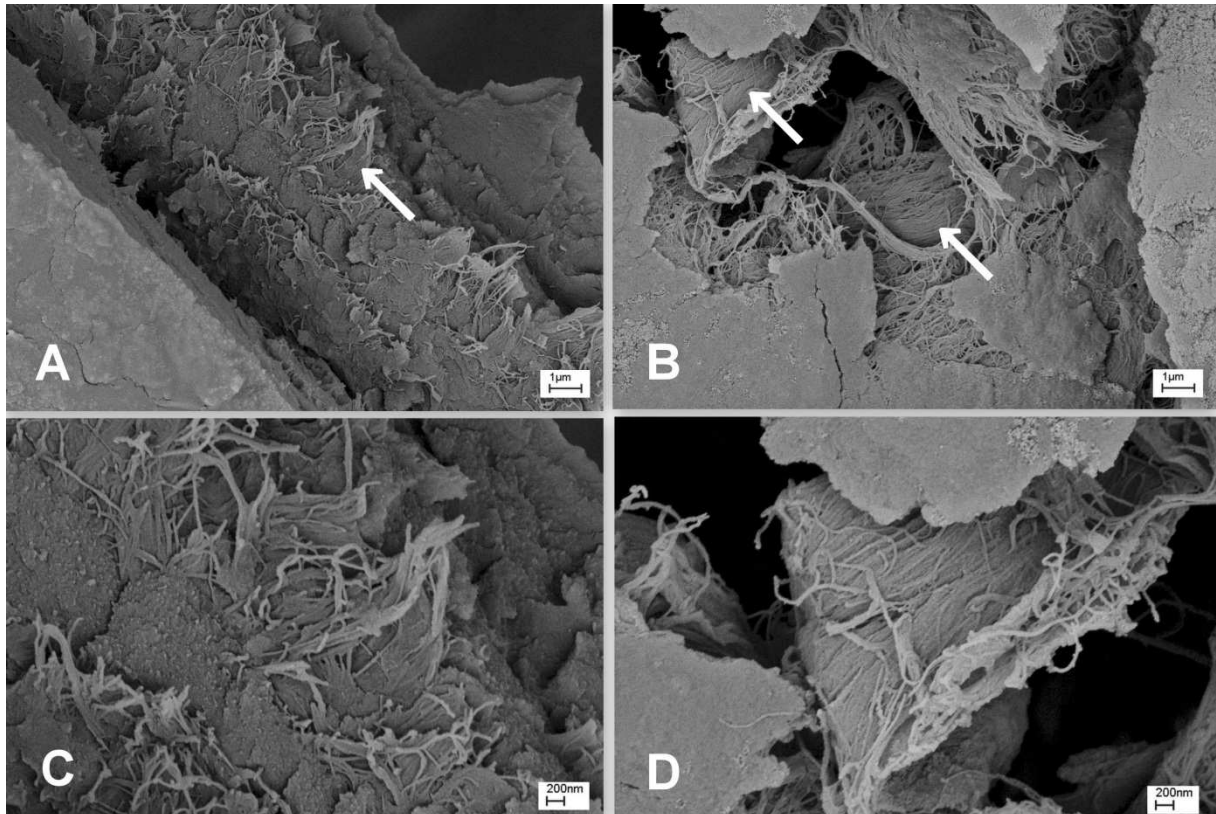


Abbildung 4.28: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der HCK- (A und C) und HuFib-Zellsheets (B und D), die durch das Aufbrechen der Oberfläche infolge der Probenpräparation die innere Ultrastruktur erkennen lassen; Teilabbildungen C und D stellen Vergrößerung der Aufnahmen A und B dar; Messbalken 1  $\mu\text{m}$  (A und B) bzw. 200 nm (C und D). Geordnete fibrilläre Strukturen sind durch Pfeile markiert.

Matrix zuzuordnen. Dabei schien im Falle der HuFib-Zellsheets das Ausmaß der Ausprägung der Collagenfibrillen größer sowie deren Orientierung insgesamt regelmäßiger zu sein als in den HCK-Zellsheets (Abbildungen 4.28 C und D).

#### 4.2.4.3 Materialprüfung

Die durch Vitamin C-Supplementierung des Kultivierungsmediums entstandenen Zellsheets konnten von der Kultivierungsoberfläche abgelöst und nach dem Aufbringen auf das schwammartige Trägermaterial der Materialprüfung unterzogen werden. Das Trägermaterial hatte dabei zum einem die Funktion, die Zellsheets vor Austrocknung zu schützen und zum

anderen sorgte es dafür, dass die Zellsheets planar, ohne eine Verdrillung, in die Probenhalter der Materialprüfmaschine eingebracht werden konnten. Anhand von Kryoschnittpräparaten konnte die Dicke dieser Zellsheets ermittelt werden (Abbildung 4.29).

Im Falle der HuFib-Zellsheets war das Ablösen von der Kultivierungsoberfläche nach einer Kultivierungszeit von 6 Wochen möglich. Die Dicke betrug zu diesem Zeitpunkt etwa 18  $\mu\text{m}$ . Die Stabilität dieser Zellsheets war allerdings sehr gering, sodass sie zumeist während der Probenpräparation für die Materialprüfung beschädigt wurden. Insgesamt konnte deshalb aus 14 Proben nur ein Messwert generiert werden (E-Modul 1,17 MPa; Zugfestigkeit 0,23 MPa). Nach einer Kultivierungsdauer von 7 Wochen hingegen wiesen die HuFib-Zellsheets eine ausreichend hohe Stabilität für die Materialprüfung auf. Nach dieser Kultivierungszeit hatten die HuFib-Zellsheets eine Dicke von 20-25  $\mu\text{m}$ . Durch die Verlängerung der Kultivierungsdauer auf bis zu 14 Wochen wurde die Dicke der HuFib-Zellsheets nicht beeinflusst (Abbildung 4.30 A).

Die Materialprüfung zur Bestimmung der biomechanischen Eigenschaften war im Falle der HCK-Zellsheets bereits ab einer Kultivierungsdauer von 5 Wochen möglich. Zu diesem Zeitpunkt wiesen die Zellsheets eine Dicke von circa 25  $\mu\text{m}$  auf. Die Ausdehnung der Kultivierungsdauer auf bis zu 14 Wochen resultierte in einer Dicke der HCK-Zellsheets von etwa 60  $\mu\text{m}$  (Abbildung 4.30 A). Für die HCK-Zellsheets, kultiviert über einen Zeitraum von 5-14 Wochen, lag der E-Modul im Bereich von 1,0-1,5 MPa (Abbildung 4.30 B). Die ermittelten Werte zeigten keine Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer, da mit zunehmender Kultivierungsdauer kein statistisch signifikanter Anstieg des E-Moduls auftrat. Im Vergleich zu den HCK-Zellsheets wurden für die HuFib-Zellsheets statistisch signifikant höhere E-Module ermittelt. Nach einer siebenwöchigen Kultivierungsdauer wiesen die HuFib-Zellsheets einen E-Modul von etwa 1,5 MPa auf, der bei Verlängerung der Kultivierungsdauer auf 14 Wochen einen statistisch signifikanten Anstieg ( $p < 0,0001$ ) auf circa 3,0 MPa zeigte (Abbildung 4.30 B).

Die Ermittlung der Zugfestigkeit der Zellsheets lieferte ähnliche Ergebnisse, wenngleich die Messwerte mit einer größeren Standardabweichung behaftet waren (Abbildung 4.30 C). Die

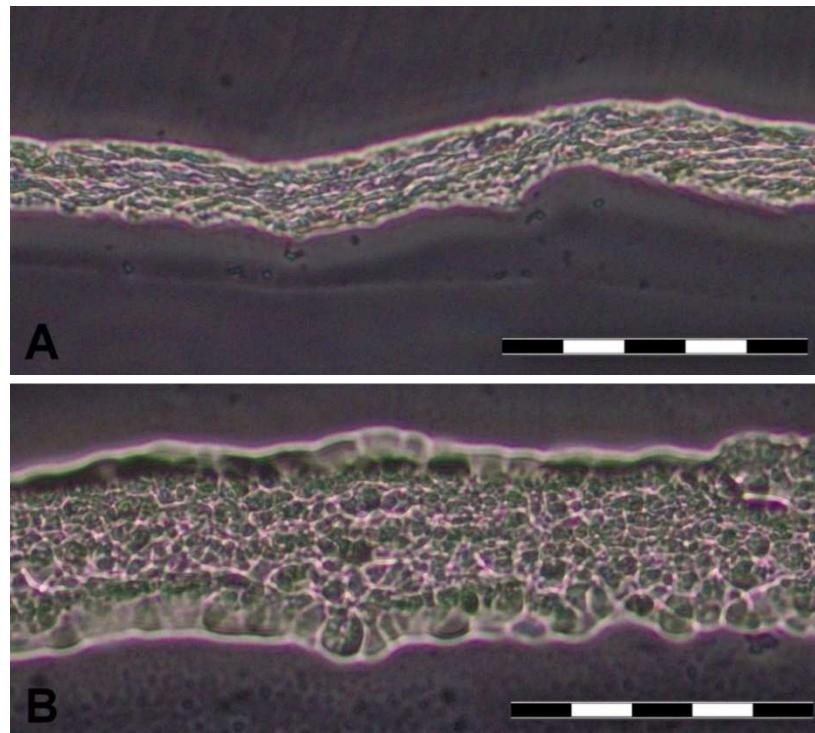


Abbildung 4.29: Lichtmikroskopische Aufnahmen mit Phasenkontrast von Kryo-Schnittpräparaten der HuFib- (A) und HCK-Zellsheets (B); Messbalken 100 µm.

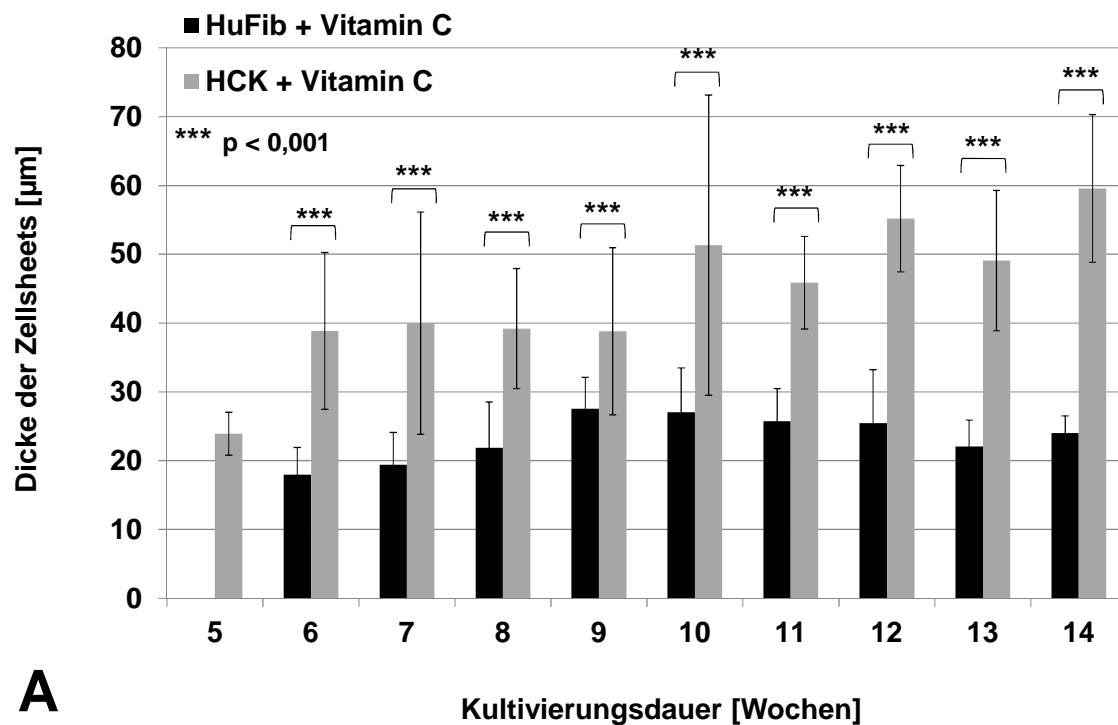


Abbildung 4.30 (A): Dicke der HuFib- und HCK-Zellsheet nach einer Kultivierungsdauer von 5-14 Wochen ( $\bar{x} \pm s_d$ ; n=6-31). In dieser Untersuchung wurden die Passagen 5-9 der HuFib-Zellen und die Passagen 36-52 der HCK-Zellen verwendet.

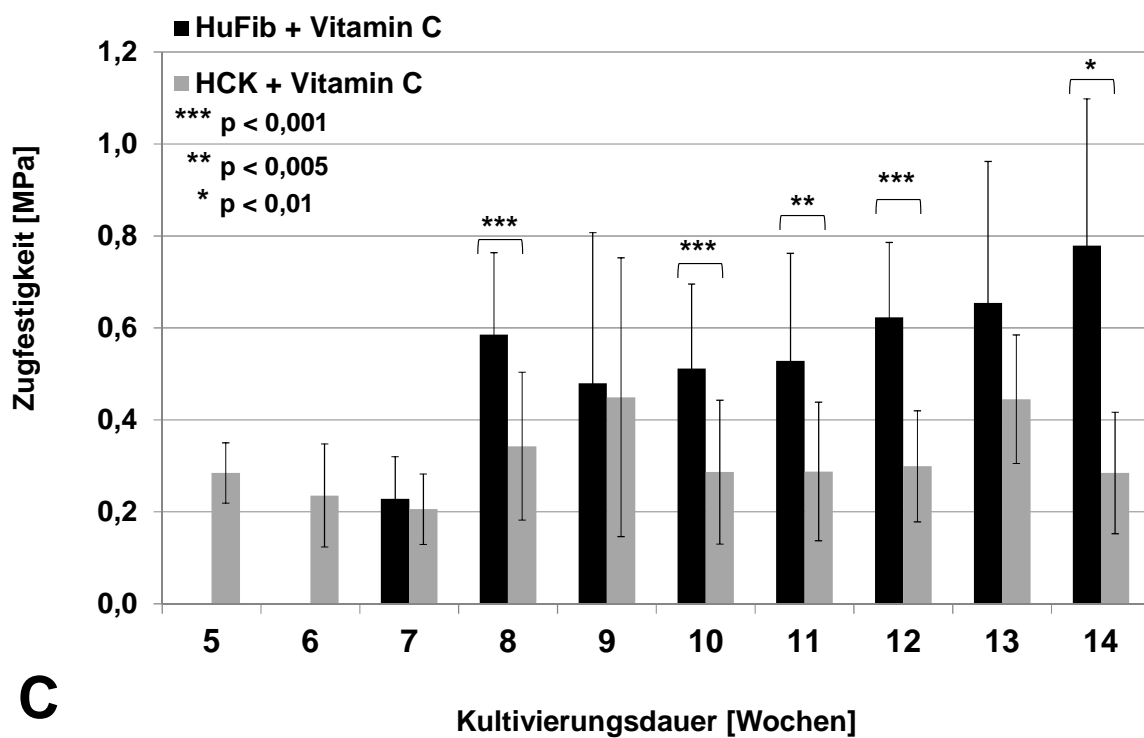
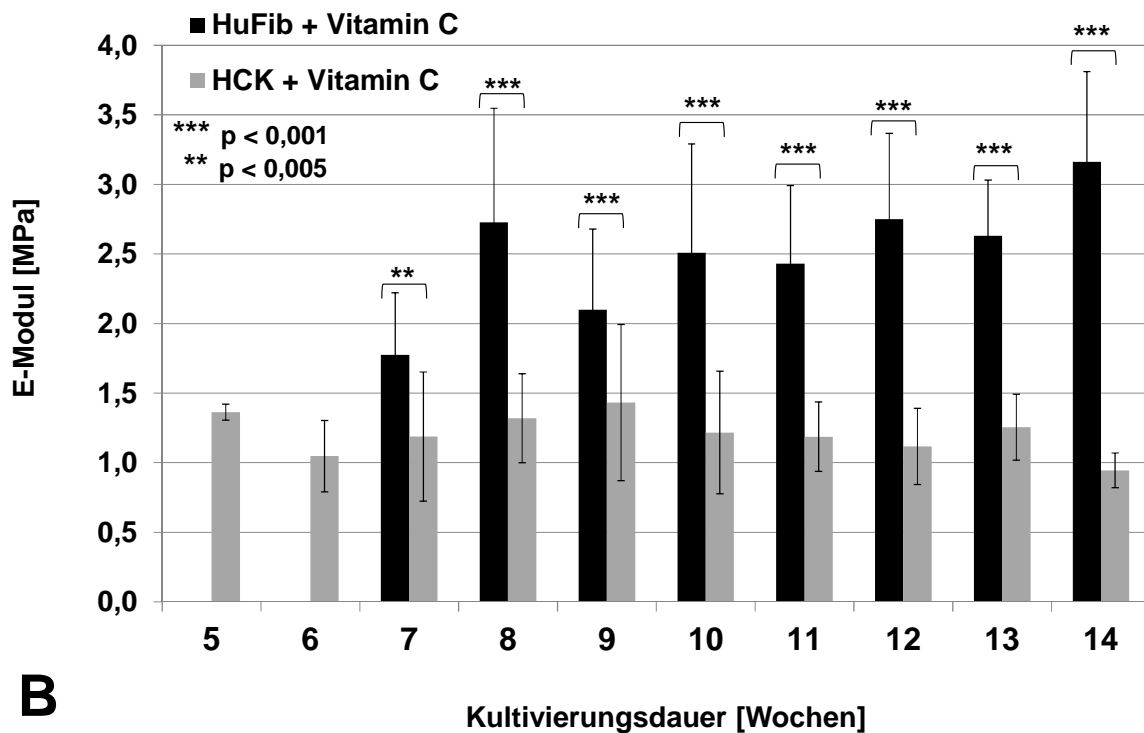


Abbildung 4.30 (B) und (C): E-Modul (B) und Zugfestigkeit (C) der HuFib- und HCK-Zellsheet nach einer Kultivierungsdauer von 5-14 Wochen ( $\bar{x} \pm sd$ ;  $n=6-31$ ). In dieser Untersuchung wurden die Passagen 5-9 der HuFib-Zellen und die Passagen 36-52 der HCK-Zellen verwendet.



Zugfestigkeit wurde für die HCK-Zellsheets zu 0,2-0,4 MPa ermittelt und zeigte, wie zuvor der E-Modul, keine Verbesserung mit zunehmender Kultivierungsdauer. Die HuFib-Zellsheets wiesen bei siebenwöchiger Kultivierung ebenfalls eine Zugfestigkeit von 0,2 MPa auf. Allerdings ließ sich für die HuFib-Zellsheet bei Ausdehnung der Kultivierungsdauer auf 14 Wochen eine statistisch signifikante Erhöhung der Zugfestigkeit auf 0,8 MPa feststellen (Abbildung 4.30 C).

#### **4.2.4.4 Ergänzende Untersuchungen an humanen dermalen Fibroblasten**

Die Kernattribute der Cornea, die Transparenz und die ausgeprägte biomechanische Festigkeit, werden ihr im Wesentlichen durch die sehr regelmäßige Anordnung der Collagenfibrillen verliehen [Maurice, 1957; Ethier et al., 2004]. Um eine bessere Beurteilung des Ordnungszustandes innerhalb der cornealen Zellsheets zu ermöglichen, wurden vergleichende Untersuchungen an Zellsheets durchgeführt, die unter den gleichen Bedingungen aus Kulturen dermalen Fibroblasten gewonnen wurden. In der Dermis der Haut sind Collagene, Elastin und die amorphe Grundsubstanz aus wasserbindenden Proteoglykanen als wichtigste Strukturkomponenten vertreten [Hussain et al., 2013; Gütt, 1998]. Der Anteil an Collagen beläuft sich dabei auf ca. 77% des fettfreien Trockengewichts [Hussain et al., 2013]. Dabei entfallen etwa 85% der collagenen Proteine auf Collagen Typ I und der übrige Anteil zum Großteil auf Collagen Typ III [Geesin et al., 1988]. Die biomechanischen Eigenschaften der Haut werden weitestgehend der Dermis zugeschrieben [Cua et al., 1990; Elsner et al., 1990]. In der Haut oder anderen Geweben mit nicht transparenter fibrillärer extrazellulärer Matrix, wie z. B. der Sklera, weisen die Collagenfibrillen eine unregelmäßige Anordnung und einen größeren, weniger einheitlichen Durchmesser auf [Borcherding et al., 1975; Ruberti und Zieske, 2008]. Neben den collagenen Proteinen ist in der Haut das Strukturprotein Elastin mit einem Anteil von etwa 4% des fettfreien Trockengewichts zu finden [Hussain et al., 2013].

Die Supplementierung mit Vitamin C bewirkt auch in Kulturen humaner dermalen Fibroblasten eine Steigerung der Collagenproduktion [Russell et al., 1981]. Dabei werden die Level der

Messenger-RNA von sowohl Collagen Typ I als auch Collagen Typ III erhöht [Geesin et al., 1988]. Diese Stimulation der Collagensynthese wurde von der kanadischen Arbeitsgruppe um Germain und Auger genutzt, um durch Langzeitkultivierung dermalen Fibroblasten zunächst dermale Zellsheets zu generieren. Durch das anschließende Stapeln von vier dieser zusammenhängenden Zellrasen sowie der Aufsaat von Keratinozyten konnten dermale Gewebeäquivalente ohne den Zusatz einer exogenen Matrix erzeugt werden [Michel et al., 1999]. Zuvor konnte die Arbeitsgruppe diesen Kultivierungsansatz bereits für den Aufbau humaner Blutgefäßäquivalente aus humanen Gefäßmuskelzellen, dermalen Fibroblasten und Gefäßendothelzellen einsetzen [L'Heureux et al., 1998].

#### **4.2.4.4.1 Lichttransmission**

Die aus HDF-Zellen gewonnenen Zellsheets zeigten bei makroskopischer Betrachtung eine deutliche Trübung (Abbildung 4.31 A). Die spektroskopische Untersuchung ergab, dass die HDF-Zellsheets bei 400 nm eine geringe Lichttransmission von circa 40% aufwiesen (Abbildung 4.31 B). Im Wellenlängenbereich bis 800 nm stieg die Lichttransmission auf bis zu 75%. Im Vergleich zu den zuvor untersuchten cornealen Zellsheets (Abbildung 4.27) waren die dermalen Zellsheets bezüglich ihrer optischen Eigenschaften diesen deutlich unterlegen.

#### **4.2.4.4.2 Rasterelektronenmikroskopie**

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der HDF-Zellsheets zeigten, dass auch hier in großem Maße Collagenfibrillen in der extrazellulären Matrix vorlagen (Abbildung 4.32 A). Im Vergleich zu den cornealen Zellsheets war der Durchmesser der Collagenfibrillen in den dermalen Zellsheets mit etwa 70 nm etwas größer. Außerdem schien die Anordnung der Fibrillen eher ungeordnet (Abbildung 4.32 B).

#### **4.2.4.4.3 Materialprüfung**

Die durch Vitamin C-Supplementierung des Kulturmediums aus humanen dermalen Fibroblasten gewonnen Zellsheets hatten nach einer achtwöchigen Kultivierungsdauer eine Dicke von  $105 \mu\text{m} \pm 25 \mu\text{m}$  (Abbildung 4.33). Diese Zellsheets wiesen einen E-Modul von  $0,76 \pm 0,13 \text{ MPa}$  und eine Zugfestigkeit von  $1,15 \pm 0,30 \text{ MPa}$  ( $n=6$ ) auf. Im Vergleich zu den cornealen Zellsheets einer entsprechenden Kultivierungsdauer zeichneten sich die dermalen Zellsheets folglich durch eine stärker ausgeprägte Dicke, einen geringeren E-Modul sowie eine höhere Zugfestigkeit aus (Abbildung 4.30).

#### **4.2.4.5 Zusammenfassende Diskussion zu Untersuchungen an Zellsheets**

Durch die Supplementierung der cornealen Zellkulturen mit Vitamin C konnten Zellsheets erzeugt werden. Es zeigte sich dabei, dass eine Mindestkultivierungsdauer für die Ablösbarkeit von der Kultivierungsoberfläche bzw. die Eignung für Folgeuntersuchungen erforderlich war, die bei den HuFib-Zellsheets bei 6 bzw. 7 Wochen und im Falle der HCK-Zellsheets bei 5 Wochen lag. Es lässt sich hier ein Zusammenhang zum Ausmaß der Sekretion der extrazellulären Matrix vermuten, die den Zusammenhalt der Zellen bedingt. Durch die vergleichende Betrachtung der erforderlichen Mindestkultivierungsdauer und des Collagengehalts über die Kultivierungsdauer (Abbildung 4.19 C) ist diese Korrelation erkennbar. Die Vitamin C-supplementierten HuFib-Zellkulturen wiesen nach fünfwöchiger Kultivierung im Vergleich zu den entsprechenden HCK-Kulturen einen weniger als halb so hohen Collagengehalt auf. Dieser Rückstand wurde aber dann durch den exponentiellen Anstieg des Collagengehalts in den Vitamin C-supplementierten HuFib-Kulturen nach siebenwöchiger Kultivierung nivelliert. Die HuFib-Kulturen ohne Vitamin C-Zugabe, die sich nicht als ein zusammenhängender Zellrasen ablösen ließen, zeigten über den gesamten beobachteten Zeitraum einen vergleichsweise niedrigen Collagengehalt. Demgegenüber war der Collagengehalt der im Standardmedium F99 kultivierten HCK-Zellen deutlich höher. Dennoch wurde in diesen Kulturen kein Zellsheet ausgebildet, wie es bei den Vitamin C-supplementierten Kulturen der Fall war. Der Zellrasen der in F99 kultivierten HCK-Zellen ließ

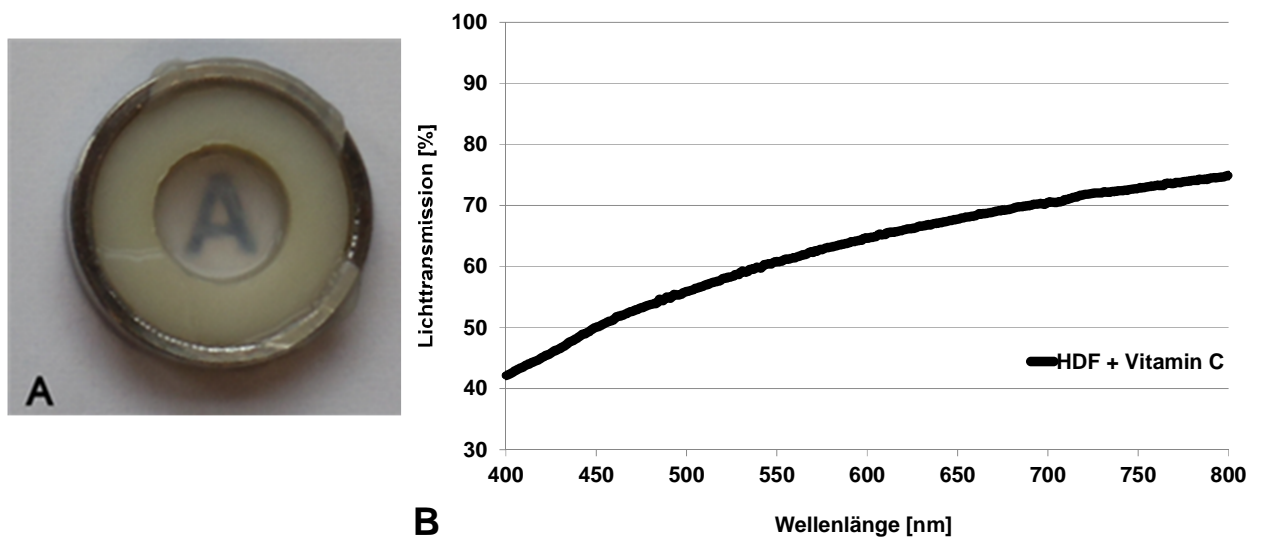


Abbildung 4.31: Transparenz der HDF-Zellsheets (A) in makroskopischer Betrachtung sowie die Bestimmung der Lichttransmission ( $\bar{x}$ ;  $n=5$ ) im Wellenlängenbereich von 400-800 nm (B).

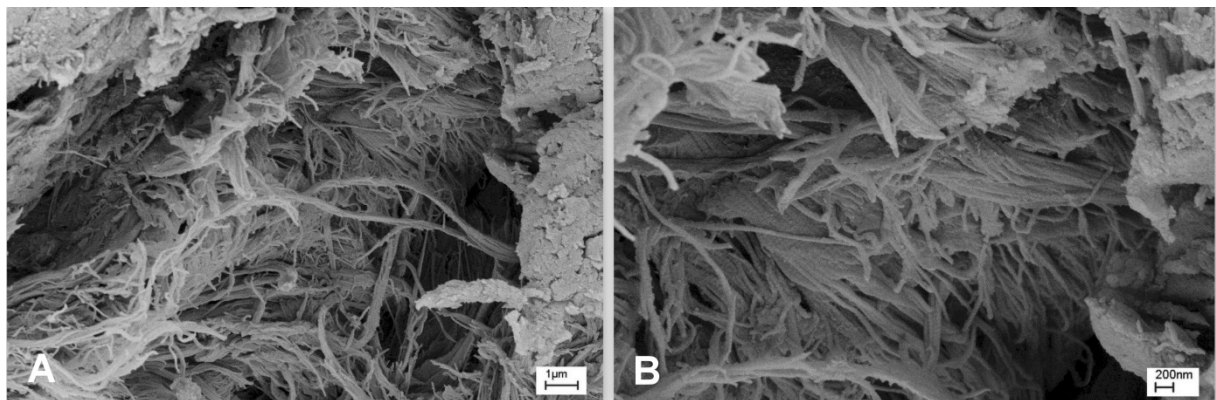


Abbildung 4.32: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der HDF-Zellsheets; Teilabbildung B stellt eine Vergrößerung der Aufnahme A dar; Messbalken 1 µm (A) bzw. 200 nm (B).

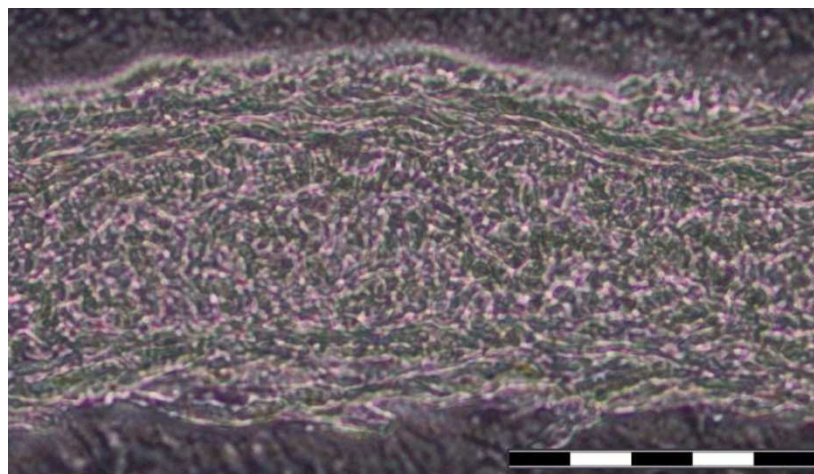


Abbildung 4.33: Lichtmikroskopische Aufnahme mit Phasenkontrast eines Kryo-Schnittpräparats von einem HDF-Zellsheet; Messbalken 100 µm.

sich nur bedingt ablösen. Wenn das Ablösen eines zusammenhängenden Stückes geglückt war, war eine zerstörungsfreie Handhabung für weitere Untersuchungen aufgrund seiner Fragilität nicht möglich. Diese Beobachtung ist höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass das Collagen, das in diesen HCK-Kulturen synthetisiert wurde, unzureichend hydroxyliert war. Das Standardmedium F99 enthält mit ca. 25 ng/ml eine geringe Konzentration Vitamin C. Diese Menge war aber offensichtlich nicht ausreichend für eine suffiziente Hydroxylierung des Collagens, die der Tripelhelix ihre Stabilität verleiht. Der Gehalt an Glykosaminoglykanen scheint für den Zusammenhalt der Zellsheets eine eher untergeordnete Rolle zu spielen, da dieser in den verschiedenen Kulturen nach vierwöchiger Kultivierung annähernd konstant blieb und durch den Zusatz von Vitamin C zum Kulturmedium nicht beeinflusst wurde (Abbildung 4.22 B).

Die biomechanischen Eigenschaften der HuFib-Zellsheets konnten ab einer Kultivierungsdauer von 7 Wochen bestimmt werden. Durch die Verlängerung der Kultivierungsdauer konnte eine Verbesserung der biomechanischen Eigenschaften erzielt werden. Im Vergleich dazu waren die HCK-Zellsheets zwar der Materialprüfung eher zugänglich, zeigten aber bei Ausdehnung der Kultivierungsdauer keine Veränderung der biomechanischen Eigenschaften, sodass sie den HuFib-Zellsheets unterlegen waren hinsichtlich E-Modul und Zugfestigkeit. In den Langzeitkulturen der HCK-Zellen war das Verhältnis von Zellzahl zur Menge synthetisierter extrazellulärer Matrix wesentlich größer. Dies könnte zu den geringer ausgeprägten biomechanischen Eigenschaften dieser Zellsheets beigetragen haben, da so pro Zelle weniger extrazelluläre Matrix für den Zellzusammenhalt zur Verfügung stand. Als weiterer Faktor könnte der Ordnungsgrad der Collagenfibrillen beteiligt gewesen sein, da die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen darauf hinwiesen, dass die Collagenfibrillen der HCK-Zellsheets im Vergleich zu den HuFib-Zellsheets in weniger geordneter Struktur vorlagen.

Bei beiden Zellarten wiesen die Collagenfibrillen einen Durchmesser von etwa 50 nm auf und waren damit deutlich dicker als im nativen Gewebe. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Forschergruppen. Guo et al. kultivierten humane corneale

Fibroblasten über einen Zeitraum von bis zu fünf Wochen in Transwell-Einsätzen in Gegenwart eines stabilen Vitamin C-Derivates [2007]. Sie konnten die Deposition von extrazellulärer Matrix nachweisen, die aus kleinen, parallel angeordneten polydispersen Fibrillen bestand mit einem durchschnittlichen Durchmesser von  $38,1 \pm 7,4$  nm. Die Autoren führten den im Vergleich zum Ursprungsgewebe größeren Fibrillendurchmesser und die Polydispersität darauf zurück, dass in den Zellkulturen ein von den nativen Gegebenheiten abweichendes Verhältnis von Collagen Typ I und Typ V vorherrschte, oder dass andere Moleküle, die den Durchmesser der Collagenfibrillen regulieren, wie z.B. Proteoglykane, fehlten. Eine weitere Übereinstimmung lässt sich in der Studie von Crabb et al. finden, die primäre humane corneale Fibroblasten auf dichten, durch thermische Dehydratation quervernetzten Collagenfilmen kultivierten und dabei die Produktion von Collagenfibrillen mit einem variablen Durchmesser von 35-75 nm beobachteten [2006].

Im Vergleich zu den cornealen Zellsheets erschienen die Fibrillen in den Zellsheets, die aus humanen dermalen Fibroblasten generiert wurden, eher zufällig angeordnet und wiesen mit etwa 70 nm einen größeren Durchmesser auf. Auch diese Beobachtung kann in den Kontext bestehender Literatur eingeordnet werden. Grinnell et al. führten Untersuchungen an dermalen Fibroblastenkulturen durch, die aus humanem Vorhautgewebe hervorgegangen waren. Der Durchmesser der von diesen Fibroblasten gebildeten Collagen Typ I-Fibrillen, wurde auf 70 nm bestimmt [1989]. Des Weiteren beschrieben Doane und Birk, dass dermale Fibroblasten, die in einem dreidimensionalen Collagengel mit ungeordneter Struktur kultiviert wurden, in dieser Matrix keinerlei Orientierung einnahmen, während sich corneale Fibroblasten zueinander orientierten und dabei orthogonale Schichten ausbildeten [1991].

Die vergleichende Betrachtung der biomechanischen Eigenschaften der dermalen und cornealen Zellsheets zeigte, dass die HDF-Zellsheets nach achtwöchiger Kultivierung mit einem E-Modul von  $0,76 \text{ MPa} \pm 0,13 \text{ MPa}$  einen niedrigeren bzw. einer Zugfestigkeit von  $1,15 \text{ MPa} \pm 0,30 \text{ MPa}$  einen höheren Wert aufwiesen als die cornealen Zellsheets. Für die gleichlang kultivierten cornealen Zellsheets ergab sich der E-Modul für die HuFib-Zellsheets zu  $2,73 \text{ MPa} \pm 0,82 \text{ MPa}$  und für die HCK-Zellsheets zu  $1,32 \text{ MPa} \pm 0,32 \text{ MPa}$ . Die

Zugfestigkeit betrug für die HuFib-Zellsheets  $0,59 \text{ MPa} \pm 0,18 \text{ MPa}$  und für die HCK-Zellsheets  $0,34 \text{ MPa} \pm 0,16 \text{ MPa}$  (Abbildung 4.30 B und C). Dies bedeutet, dass die cornealen Zellsheets im Vergleich zu den dermalen Zellsheets im linear elastischen Verformungsbereich einen größeren Widerstand gegen die Verformung aufwiesen. Im Gegenzug widerstanden die dermalen Zellsheets im nichtlinearen Verformungsbereich größeren Kräften, bis ein Bruch der Probe erfolgte, sodass, trotz Berücksichtigung der deutlich stärker ausgeprägten Probendicke der dermalen Zellsheets, eine höhere Zugfestigkeit resultierte. Ursächlich dafür könnte das Vorhandensein von elastischen Fasern in dermale Gewebe sein, die der Haut Elastizität verleihen, und auch der unterschiedliche Ordnungsgrad der Collagenmatrix. Die biomechanischen Eigenschaften der Haut werden im Wesentlichen durch das Netzwerk aus collagenen und elastischen Fasern bestimmt, das in eine viskose Grundsubstanz eingebettet ist. Die Epidermis spielt dabei nur eine untergeordnete Rolle [Cua et al., 1989]. Elastische Fasern, die sich aus Elastin und mikrofibrillären Proteinen zusammensetzen, sorgen für die hohe Dehnbarkeit der Haut, indem sie zwar nur 1/25 der Festigkeit von Collagen aufweisen, aber auf das 2-3-fache ihrer Ausgangslänge dehnbar sind [Gütt, 1998]. Die Collagenfasern, die in der Haut im entspannten Zustand als lockeres, gewelltes, schlaffes Netzwerk vorliegen, werden bei Dehnung der Haut entwellt und gestreckt und richten sich parallel zueinander in Richtung der Hauptdehnung aus. Mit steigender Zugspannung werden zunehmend mehr Collagenfasern gedehnt, die dadurch zur Übertragung der Spannung beitragen. Gleichzeitig steigt die Widerstandskraft, die sich zur Spannung proportional verhält, bis sie bei vollständiger Dehnung der Faser ein Maximum erreicht [Gütt, 1998].

Hinsichtlich der Lichttransmission waren die Zellsheets, die aus HuFib-Zellen generiert wurden, denen aus HCK-Zellen entstandenen überlegen. Beide wiederum wiesen eine deutlich höhere Lichtdurchlässigkeit im untersuchten Wellenlängenbereich auf als die dermalen Zellsheets. Diese Abstufung war bereits bei makroskopischer Betrachtung der in die Ringkonstruktion eingespannten Zellsheets erkennbar. Dabei können der Ordnungszustand der extrazellulären Matrix, die Dicke der Zellsheets sowie das Verhältnis

von Zellzahl zu extrazellulärer Matrix als einflussnehmende Größen auf die Lichttransmission angenommen werden, denn insgesamt betrachtet lässt sich feststellen, dass die dünnen HuFib-Zellsheets, die eine geringe Zelldichte und außerdem den höchsten Ordnungsgrad der Collagenfibrillen aufwiesen, eine optimale Lichttransmission erlauben. Dementsprechend zeichneten sich die dicken dermalen Zellsheets mit einer zufälligen Anordnung der Collagenfibrillen durch schlechte optische Eigenschaften aus. Die HCK-Zellsheets mit einer mittleren Dicke, einer im Vergleich zu den HuFib-Zellsheets erhöhten Zelldichte und einem Ordnungszustand der Collagenfibrillen, der geringer als bei den HuFib-Zellsheet, aber höher als bei den dermalen HDF-Zellsheets war, lagen hinsichtlich der Lichttransmission im mittleren Bereich. Somit erscheint ein Einfluss von Ordnungsgrad der extrazellulären Matrix, der Zellsheetdicke sowie ihrer Zelldichte auf die Lichttransmissionseigenschaften plausibel. Anhand der hier durchgeführten Untersuchungen ist allerdings keine Aussage darüber möglich, welcher dieser Faktoren den größten Einfluss auf die optischen Eigenschaften der Zellsheets ausübte. Die Abhängigkeit der optischen Eigenschaften von Zellsheets, die durch mehrwöchige Vitamin C-Supplementierung humaner Fibroblasten erzeugt wurden, vom eingesetzten Zellmaterial wurde bereits in einer Studie untersucht [Carrier et al., 2009]. In dieser Studie wurden verschiedene Konstrukte erzeugt, indem stromale und dermale Zellsheets generiert und gemeinsam mit entweder stromalen oder dermalen Epithelzellen kultiviert wurden. Die Konstrukte wurden zum einen makroskopisch hinsichtlich ihrer Transparenz beurteilt, zum anderen wurden die Absorptionseigenschaften unter Normierung auf die Dicke der Konstrukte bestimmt. Die homotypischen cornealen Konstrukte aus cornealen Fibroblasten und cornealen Epithelzellen waren makroskopisch einheitlich transparent und wiesen den geringsten scheinbaren Absorptionskoeffizienten auf, während die homotypischen dermalen Konstrukte deutlich opak waren und den höchsten scheinbaren Absorptionskoeffizienten zeigten. Die von den heterotypischen Konstrukten aus cornealen Fibroblasten und dermalen Epithelzellen bzw. aus dermalen Fibroblasten und cornealen Epithelzellen exprimierten optischen Eigenschaften lagen zwischen denen der beiden homotypischen Konstrukte. Dieses Ergebnis zeigt, dass corneale und dermale Konstrukte



sich unterscheiden bezüglich ihrer Fähigkeit, Licht passieren zu lassen. Darüber hinaus wird durch den Einsatz unterschiedlicher Epithelien auf dem gleichen Zellsheet-Typ deutlich, dass die hierfür eingesetzten Zellen per se die optischen Eigenschaften beeinflussen.

## **5       Abschlussdiskussion**

### **5.1       Rekonstruktion des Stromas für In-vitro-Arzneistoffabsorptions- untersuchungen**

Bereits 1959 postulierten Russel und Burch das 3R-Prinzip, das in der tierexperimentellen Forschung Anwendung finden sollte. Demnach ist die Anzahl der Versuchstiere auf das erforderliche Mindestmaß zu reduzieren (reduction), die Versuchsbedingungen sind zu verfeinern, sodass Schmerzen und Leiden auf ein Minimum gesenkt werden (refinement), und prinzipiell sind alle Möglichkeiten zu nutzen, Tierversuche durch alternative Testmethoden zu ersetzen (replacement). Dieses Leitbild legte den Grundstein für die Entwicklung von Alternativmethoden zu Tierversuchen. Die Forderung der Reduktion von Tierversuchen wurde schließlich mittels der Direktive 86/609/EEC der Europäischen Union in der europäischen Gesetzgebung verankert. Demnach darf kein Tierexperiment durchgeführt werden, wenn dafür eine alternative Testmethode zur Verfügung steht [EEC, 1986]. Dadurch wurde die Bedeutung der Entwicklung und Validierung von In-vitro-Testmethoden zum Ersatz von Tierversuchen bekräftigt.

Die Untersuchung der Arzneistoffaufnahme ist unabdingbar bei der Entwicklung neuer ophthalmologischer Wirkstoffe oder neuer Formulierungen bereits bekannter Wirkstoffe zur Anwendung am Auge. Da die Permeation durch die Hornhaut die wesentliche Absorptionsroute für topisch am Auge applizierte Pharmaka darstellt, wird corneales Gewebe vielfach in In-vitro-Permeationsuntersuchungen eingesetzt. Zumeist wird auf exzidiertes tierisches Gewebe zurückgegriffen, da das selten zur Verfügung stehende humane Gewebe im Wesentlichen für Gewebetransplantationen benötigt wird. Nur in dem Falle, dass das humane Gewebe aufgrund von morphologischen oder funktionellen Unzulänglichkeiten, wie beispielweise einer zu geringen Endothelzellichte, nicht für Transplantationszwecke geeignet ist, kann es für Forschungszwecke, wie In-vitro-Untersuchungen zur cornealen Arzneistoffabsorption oder zur Etablierung humaner cornealer Zellkulturen, eingesetzt

werden. Der Einsatz von tierischem Corneagewebe, bei dem es sich zumeist um Kaninchencorneae handelt, weist allerdings einige wesentliche Nachteile auf. Neben den ethischen Bedenken, Tiere zu Versuchszwecken zu halten, können selbst innerhalb der gleichen Spezies bedeutsame interindividuelle Unterschiede der Permeabilität bestehen. Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob die anhand von In-vivo- oder In-vitro-Tiermodellen ermittelten Daten direkt auf das menschliche Auge übertragbar sind, da wesentliche anatomische und physiologische Unterschiede zwischen dem tierischen und dem humanen okularen Gewebe bestehen, die Einfluss auf die Barriereigenschaften nehmen können [Hornof et al., 2005]. So zeichnet sich die Kaninchencornea, im Vergleich zur humanen Hornhaut, durch ein dichteres, mehr Keratozyten enthaltendes Stroma aus [Becker et al., 2008]. Außerdem ist die Blinzelfrequenz, die wesentlich zur präcornealen Drainage beiträgt, beim Kaninchenauge deutlich niedriger und die Hornhautoberfläche ist etwa um den Faktor 1,5-2 größer im Vergleich zum menschlichen Auge. Des Weiteren fehlt Albinokaninchen das Melaninpigment in der anterioren Uvea, das im menschlichen Auge durch die Fähigkeit zur Bindung zahlreicher Wirkstoffe zu deren verzögerter Elimination und dadurch verlängerten Wirkdauer beiträgt [Hornof et al., 2005].

Um die physiologischen Bedingungen der cornealen Barriere aus sowohl lipophilen als auch hydrophilen Bereichen möglichst adäquat nachzustellen, sollte ein In-vitro-Modell zur Untersuchung der cornealen Arzneistoffpermeation ebenfalls einen mehrschichtigen Aufbau besitzen. Außerdem bietet im Speziellen die Verwendung immortalisierter Zelllinien den Vorteil einer konstant proliferierenden, über eine Vielzahl von Passagen gleichbleibenden Zellpopulation, die beim Aufbau von Gewebeäquivalenten für In-vitro-Untersuchungen zu minimaler Produktvariabilität führt. Dadurch verspricht der Einsatz immortalisierter Zelllinien ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit, was Voraussetzung für die Etablierung eines standardisierten In-vitro-Modells für corneale Arzneistoffabsorptionsuntersuchungen ist als Ersatz für exzidiertes humanes Gewebe. Um die mechanische Stabilität der häufig verwendeten Collagengelmatrizes zu erhöhen, wurde der Einsatz verschiedener Methoden untersucht, insbesondere die Anwendung von chemischen Agenzien zur Einführung von

Quervernetzungen, wobei sich beispielsweise Glutaraldehyd oder Carbodiimide als zweckmäßig erwiesen haben [Griffith et al., 2009].

### **5.1.1 Aufbau des Cornea-Konstruktes für In-vitro-Arzneistoffabsorptionsuntersuchungen**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das in der Arbeitsgruppe bereits etablierte Cornea-Modell für In-vitro-Arzneistoffabsorptionsuntersuchungen an die Verwendung der immortalisierten HCK-Zelllinie zum Aufbau des Stromabioäquivalentes adaptiert werden. Es konnte dabei gezeigt werden, dass die HCK-Zellen bei gleicher Zelldichte eine geringere Kontraktion der Gelmatrix des Stromas hervorrufen als die zuvor verwendeten nativen humanen cornealen Fibroblasten. Dies deutet an, dass bei der Transformierung dieser Zelllinie der Keratozyten-Phänotyp zumindest teilweise erhalten geblieben ist, denn die Wundheilung, deren Bestandteil die Kontraktion der Wundränder ist, wird in vivo durch den Fibroblasten- und den Myofibroblasten-Phänotyp vermittelt [West-Mays und Dwivedi, 2006; Fini, 1999]. Diese These müsste durch weitere Untersuchungen hinsichtlich keratozytentypischer Marker verifiziert werden, wie z.B. der Expression des Proteoglykans Keratocan oder der Aldehyddehydrogenase, die in ruhenden Keratozyten intrazellulär in großer Menge auftritt und während der Wundheilung stark runterreguliert wird [Beales et al., 1999; Berryhill et al., 2002; Funderburgh et al., 2003; Musselmann et al., 2005]. Für die Nutzung der HCK-Zellen im Cornea-Modell musste die Zellzahl um den Faktor 5 erhöht werden, um eine Kontraktion der Stromabiomatrix und die damit verbundene Erhöhung der Stabilität zu erreichen, die äquivalent ist zu der Kontraktion, die zuvor bei Verwendung von HuFib-Zellen für den Aufbau des Cornea-Modells erhalten wurde.

Neben den immortalisierten HENC- und HCK-Zellen zum Aufbau der endothelialen bzw. stromalen Schicht wurde die epitheliale humane corneale HCE-T-Zelllinie eingesetzt. Diese konnte bereits zuvor ihre Eignung für den Aufbau des Cornea-Modells zeigen, da sie in der Lage ist, eine sehr dichte tight junction-Barriere auszubilden [Reichl, 2008; Döhring, 2009].

Immortalisierte Zelllinien können, im Gegensatz zu nativen Zellen, die nach wenigen Passagen in die Seneszenz übergehen, über eine Vielzahl von Passagen kultiviert werden, ohne eine Veränderung ihrer Eigenschaften zu zeigen. Der Aufbau des Cornea-Modells unter Einsatz von ausschließlich immortalisierten Zelllinien steigert daher die Standardisierbarkeit und die Reproduzierbarkeit, die für ein In-vitro-Modell höchst wünschenswert sind.

Für das Kultivierungsprotokoll des Cornea-Modells aus immortalisierten Zelllinien konnte eine vollständige Angleichung des Zellkulturmediums nicht erreicht werden. Bereits bei der Kultivierung der Zellen im Monolayer wurde festgestellt, dass die HENC- und auch die HCK-Zellen auf das Sasaki-Medium der HCE-T-Zellen mit einer geminderten Wachstumsrate und einer veränderten Morphologie reagierten, trotz des Verzichts auf das Supplement Choleratoxin, das bekanntermaßen einen hemmenden Effekt auf Fibroblasten ausübt [Taylor-Papadimitriou et al., 1980]. Auch bei der dreidimensionalen Kultivierung der HCK-Zellen in der Collagengelmatrix war dieser hemmende Effekt an einer verminderten Kontraktion erkennbar. Die in der vorliegenden Studie beobachtete Hemmung ist höchstwahrscheinlich auf das Supplement DMSO zurückzuführen. Dieses kann aber nicht aus dem Sasaki-Medium entfernt werden, da es sehr förderlich ist für die Ausbildung einer dichten epithelialen Barriere durch die HCE-T-Zellen [Hahne und Reichl, 2011]. So erfolgte die Kultivierung des Modells in dem Standardmedium der HENC- und HCK-Zellen, bis bei der Aufsaat der Epithelzellen der Wechsel auf das Sasaki-Medium vollzogen wurde. Allerdings konnte durch die Variation des Konstruktaufbaus, unter Verzicht auf das azelluläre Bodengel, die für die ungehemmte Kontraktion zur Verfügung stehende Kultivierungszeit um 3 Tage erhöht werden und gleichzeitig die erforderliche Kultivierungsdauer des Cornea-Modells insgesamt um 4 Tage verkürzt werden. Darüber hinaus wurde das so optimierte Kultivierungsprotokoll auf die Herstellung miniaturisierter Cornea-Modelle übertragen. Dieses bietet den Vorteil, dass bei gleichem Materialeinsatz die dreifache Anzahl an Konstrukten für Untersuchungen zur Verfügung steht. Aus diesen mHCC wurden die Stromabioäquivalente

abgeleitet, an denen die Eignung der Riboflavin/UVA-Methode zur Erhöhung der Festigkeit der Collagengelmatrix des Cornea-Modells untersucht wurde.

### 5.1.2 Anwendung der Riboflavin/UVA-Methode an Stromabioäquivalenten

Die Riboflavin/UVA-Methode findet bereits erfolgreich klinische Anwendung in der Ophthalmologie zur Vermeidung der Progredienz des Keratokonus [Wollensak et al., 2003a; Kohlhaas, 2008; Raiskup und Spörl, 2013b]. Die Anwendung der Kombination des Photosensibilisators Riboflavin und UVA-Licht einer Wellenlänge von 365 nm konnte auch im in vitro hergestellten Stromabioäquivalent für eine Quervernetzung der Collagenfibrillen sorgen. Dies war zum einen durch die gelelektrophoretische Untersuchung anhand des Auftretens hochmolekularer Banden sowie der Abschwächung der  $\alpha$ -Banden des Collagenmoleküls erkennbar. Zum anderen war bei der oszillationsrheologischen Untersuchung eine statistisch signifikante, von der Bestrahlungsdosis abhängige Zunahme des elastischen Moduls und damit der Festkörpereigenschaften der Stromabioäquivalente messbar. Allerdings war dieser Verfestigungseffekt insgesamt gering, sodass in Hinblick auf die Robustheit der Stromabioäquivalente beim Einbringen in die Apparaturen für Arzneistoffabsorptionsuntersuchungen keine Verbesserung zu erwarten war. Das Ausbleiben einer ausreichend hohen Verfestigung der Stromabioäquivalente ist höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der Collagengehalt um den Faktor 10 niedriger ist als im nativen Stromagewebe, sowie auf die ungeordnete Struktur der Collagenfibrillen innerhalb der Gelmatrix der Stromabioäquivalente, die sich damit deutlich von den in vivo gegebenen Bedingungen unterscheidet. Infolge der daraus resultierenden mangelnden Nähe der einzelnen Collagenfibrillen zueinander wird eine durch die Riboflavin/UVA-Behandlung initiierte chemische Verknüpfungsreaktion erschwert.

Durch die Untersuchung der Zellviabilität via MTT-Assay konnte ermittelt werden, dass die Riboflavin/UVA-Behandlung zu einer Reduktion der Stoffwechselleistung der in der Stromabiomatrix inkorporierten HCK-Zellen führte. Dabei hatte bereits eine im Vergleich zur klinisch applizierten Bestrahlungsdosis niedrige Strahlenbelastung einen ausgeprägt

schädigenden Effekt. Es konnte für diese Schädigung eine deutliche Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis festgestellt werden, während das Vitamin Riboflavin allein keinen schädigenden Effekt ausübte. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die Riboflavin/UVA-Behandlung der Stromabioäquivalente zu einer nachhaltigen Schädigung der HCK-Zellen führte, da nach Applikation einer Bestrahlungsdosis, bei der initial ein Anteil der HCK-Zellen die Traumatisierung überstanden hatte, die Zellviabilität bei weiterer Kultivierung über bis zu 3 Wochen weiter abnahm. Im Gegensatz dazu kann bei der klinischen Anwendung genutzt werden, dass nur der zentrale corneale Bereich der UVA-Strahlung ausgesetzt wird, sodass Keratozyten aus dem nicht traumatisierten Nachbarareal einwandern können und innerhalb von 6 Monaten zu einer vollständigen Regeneration der Keratozytenpopulation des Stromas führen [Spörl et al., 2007, 2008].

### **5.1.3 Anwendung der Riboflavin/UVA-Methode an Monolayerkulturen**

Um den Vorgang der Zellschädigung, ausgelöst durch die Riboflavin/UVA-Methode, tiefer zu ergründen, wurden weitere Untersuchungen an Monolayerkulturen angeschlossen. Diese erlaubten zum einen durch eine mikroskopische Betrachtung morphologische Veränderungen der Zellkulturen sehr einfach zu erkennen. Dies war im Vergleich dazu in den Stromabioäquivalenten, in denen die Zellen vereinzelt in einer Collagenmatrix vorliegen, erschwert. Zum anderen konnten Zellassays zur Diskriminierung apoptotischer und nekrotischer Vorgänge durchgeführt werden. Deren Anwendung an Stromabioäquivalenten wäre nachteilig gewesen, da entweder bei Anwendung an vollständigen Stromabioäquivalenten eine große Menge des kostenintensiven Assayreagenzes hätte eingesetzt werden müssen oder aber ein vorgeschalteter Schritt des Aufschlusses der Stromabioäquivalente zum Herauslösen der Zellen erforderlich gewesen wäre, der unter Umständen das Ergebnis verfälscht hätte. Durch die Untersuchung der Zellviabilität in Monolayerkulturen mittels MTT-Assay konnte gezeigt werden, dass die Traumatisierung der 2D-Kulturen im gleichen Strahlendosenbereich auftritt wie bei den Stromabioäquivalenten nach deren beidseitiger Bestrahlung. Daher kann davon ausgegangen werden, dass sich die

der Schädigung zugrundeliegenden Mechanismen sehr ähnlich darstellen. Sowohl für die dreidimensionalen Stromabioäquivalente als auch für die zweidimensionalen Monolayerkulturen zeigte die alleinige Inkubation mit dem Zusatz von Riboflavin zum Zellkulturmedium ohne eine Bestrahlung keinen schädigenden Effekt auf die Zellen. Die Abhängigkeit der Zellviabilitätsabnahme in Monolayerkulturen nach Riboflavin/UVA-Behandlung von der Bestrahlungsdosis ist ebenfalls deutlich erkennbar und wurde durch die mikroskopische Betrachtung der Zellkulturen bestätigt.

Durch weiterführende Untersuchungen an den Monolayerkulturen wurde auf die Beteiligung apoptotischer und nekrotischer Prozesse geprüft. Es konnte dabei festgestellt werden, dass wiederum in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis sowohl Apoptose als auch Nekrose die Zellviabilität beeinträchtigen. Während bei niedrigen Bestrahlungsdosen bis  $1,5 \text{ J/cm}^2$  Apoptose überwog, waren bei den höheren Bestrahlungsdosen vornehmlich nekrotische Prozesse ursächlich für das Zellsterben. Dieser Befund wurde übereinstimmend durch die lumineszenzbasierten Zellassays und die Apoptose-Nekrose-Fluoreszenzfärbung erhalten. Darüber hinaus konnte durch die Messung der Aktivitäten der Caspasen 8 und 9 gezeigt werden, dass die Apoptose nach Riboflavin/UVA-Behandlung sowohl über den intrinsischen als auch über den extrinsischen Pfad der Caspasekaskade eingeleitet wird. Der Befund, dass strahlendosisabhängig apoptotische oder nekrotische Prozesse überwiegen, ist auch für die klinische Anwendung von Bedeutung, da nekrotische Prozesse zu einer Schädigung von Nachbarzellen führen können, während Apoptose die Einzelzelle betrifft. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass der hier gefundene Strahlendosisbereich für überwiegend nekrotische bzw. apoptotische Prozesse nicht ohne Weiteres auf die Anwendung der Riboflavin/UVA-Methode in vivo zu übertragen ist. Zum einen handelt es sich bei den in vivo vorliegenden ruhenden Keratozyten um einen anderen Zelltyp im Vergleich zur immortalisierten HCK-Zelllinie, die in der vorliegenden Studie eingesetzt worden ist, sodass nicht zwangsläufig die gleiche Strahlendosis auf die gleiche Art und Weise eine Schädigung hervorruft. Zum anderen enthält das native Gewebe eine deutlich höhere Dichte an Collagenfasern, die sich höchstwahrscheinlich vermindern auf die Eindringtiefe und Intensität der Strahlung



auswirken. In vivo kommt es zu einer exponentiellen Abnahme der UV-Intensität entsprechend des Lambert-Beer-Gesetzes, sodass 65% der UV-Intensität in den ersten 200 µm des Stromas absorbiert werden [Spörl et al., 2008]. Wollensak et al. konnten durch Untersuchungen an Kaninchencorneae zeigen, dass apoptotische Prozesse auch in vivo durch die Riboflavin/UVA-Behandlung ausgelöst werden bei Anwendung einer Strahlendosis bis zu 7,2 J/cm<sup>2</sup> [2004b]. Ebenso wurde in muriner Cornea Apoptose nachgewiesen, die durch die Riboflavin/UVA-Behandlung induziert worden war [Wang, 2008].

### 5.1.4 Fazit zur Anwendung der Riboflavin/UVA-Methode

Insgesamt betrachtet führt die Anwendung der Riboflavin/UVA-Methode an Stromabioäquivalenten und zweidimensionalen Zellkulturen zu einer deutlichen und nachhaltigen Verminderung der Zellviabilität. Diese Traumatisierung wird bestrahlungsdosisabhängig vornehmlich über Apoptose oder Nekrose vermittelt. Der mit dieser Methode erzielte Verfestigungseffekt der Collagenmatrix der Stromabioäquivalente ist hingegen klein, sodass sich insgesamt das Fazit ziehen lässt, dass die kombinierte Behandlung der Stromabioäquivalente mit dem Photosensibilisator Riboflavin und UVA-Licht keine geeignete Methode ist, um die Stromabiomatrix des Cornea-Konstruktes für In-vitro-Arzneistoffabsorptionsuntersuchungen zu verfestigen.

Parallel zu den hier vorgestellten Untersuchungen konnte innerhalb der Arbeitsgruppe ein serumfreies Kultivierungsprotokoll der HCE-T- und HCK-Zellen etabliert werden. Aus diesen ließ sich ein Hemicornea-Modell aufbauen, dessen Collagenmatrix durch die Serumfreiheit keiner Kontraktion unterlag. Diese Art der Kultivierung machte ein Einbringen des Cornea-Konstruktes in eine entsprechende Permeationsvorrichtung, wie Ussing-Kammer oder Franzzelle, unnötig, da es möglich war, die In-vitro-Arzneistoffabsorptionsuntersuchungen in den für die Kultivierung eingesetzten Transwell-Membraneinsätzen durchzuführen [Hahne und Reichl, 2011]. Daher konnte auf eine Verfestigung der Collagengelmatrix verzichtet werden. Dieses serumfreie humane Hemicornea-Modell konnte bereits innerhalb einer Prävalidierungsstudie, bei der sowohl die Intra- als auch die Interlaborvariabilität getestet

wurden, zeigen, dass das robuste Kultivierungsprotokoll mit guter Reproduzierbarkeit zu einem Cornea-Modell führt, das gegenüber diversen Testsubstanzen sehr unterschiedlicher physikochemischer Eigenschaften Permeationsbarriereigenschaften aufweist, die mit denen tierischer exzidierter Hornhäute vergleichbar sind [Hahne et al., 2012].

## **5.2       Rekonstruktion des Stromas als Gewebeersatz**

Die Cornea bildet eine effektive Barriere gegenüber von außen eindringenden Umweltreizen und ist darüber hinaus essentiell für die Lichttransmission, Refraktion und Sehfähigkeit im Allgemeinen. Diese Funktionen kann die Hornhaut aufgrund ihrer speziellen Struktur wahrnehmen. Die Transparenz und die ausgeprägte mechanische Festigkeit sind auf die extrem geordnete Struktur der Collagenfibrillen des Stromas zurückzuführen [Ruberti und Zieske, 2008]. Gemäß der Weltgesundheitsorganisation sind corneale Erkrankungen die zweithäufigste Ursache für Erblindung mit mehr als 10 Millionen Betroffenen weltweit [Whitcher et al., 2001; Carlsson et al., 2003]. Dafür stellt die Hornhauttransplantation humanen Spendergewebes die einzige, weithin akzeptierte Behandlungsmöglichkeit dar, wobei die Erfolgsrate einer solchen Transplantation von der Verfügbarkeit qualitativ hochwertiger Spendercorneae und der Patientenkonstitution abhängt [Carlsson et al., 2003]. Es ist davon auszugehen, dass, bedingt durch das Altern der Gesellschaft und die gestiegene Lebenserwartung, der Bedarf an Spendercorneae weiter ansteigt, während ihre Verfügbarkeit abnimmt. Durch die Ausbreitung von Infektionskrankheiten, wie z.B. Hepatitis oder HIV, und die zunehmende Beliebtheit von refraktiver Chirurgie, die das Gewebe für eine mögliche Transplantation unbrauchbar macht, wird der Pool an geeigneten humanen Spendercorneae weiter geschmälert [Carlsson et al., 2003].

Eine Alternative zur Transplantation humaner Spendercornea könnte zukünftig die Verwendung von in vitro hergestellten Corneae sein. Ein solches in vitro erzeugtes Gewebeäquivalent könnte sinnvollen Einsatz bei verschiedenen Augenerkrankungen finden, die eine Substitution des cornealen Gewebes erforderlich machen. Dabei könnte sich ein In-vitro-Modell des cornealen Gewebes als vorteilhaft erweisen angesichts der Schwierigkeiten,

die mit einer klassischen Cornea-Transplantation verbunden sind, wie der geringen Verfügbarkeit geeigneter humaner Spenderhornhäute, der Möglichkeit einer Infektionsübertragung und dem Risiko der Transplantatabstoßung. Allerdings stellt das Nachbilden der speziellen Ultrastruktur des Stromas in vitro durch Techniken der Zellkultivierung eine große Herausforderung dar, sodass bisher kein solches Modell in klinischen Studien getestet wurde. Es ist zusätzliche Grundlagenforschung notwendig, um die Vorgänge bei der Entstehung des humanen cornealen Gewebes in vivo und der dabei beteiligten Faktoren so präzise wie möglich aufzuklären, um dieses Verständnis bei der In-vitro-Nachbildung des Gewebes einsetzen zu können.

In vivo werden die einzelnen Peptidstränge des fibrillären Strukturproteins Collagen intrazellulär an den Ribosomen geknüpft, und die zunächst entstandenen Procollagen-Einzelstränge gelangen im Anschluss in das Innere des rauen Endoplasmatischen Retikulums [Hulmes, 2008]. Im Folgenden wird durch Dioxygenasen, die zweiwertiges Eisen enthalten, die Hydroxilierung der Aminosäuren Prolin und Lysin vermittelt. Vitamin C hält das Eisen im zweiwertigen Zustand und sorgt damit für die Aufrechterhaltung der Aktivität der Enzyme [Rehm und Hammar, 2005; Stryer, 1996]. Im Endoplasmatischen Retikulum unterliegen die Procollagen-Stränge O- und N-Glykosilierungen, bevor sich drei dieser langgestreckten Peptidstränge zu einer rechtgängigen, 300 nm langen Tripelhelix umeinander winden [Rehm und Hammar, 2005; Hulmes, 2008]. Dann gelangen die Moleküle in den Golgi-Apparat, wo sie in sekretorische Vesikel verpackt werden. Während oder kurz nach der Sekretion wird das Procollagen durch Metalloproteinasen zu Collagen prozessiert, indem die terminalen Propeptidsequenzen abgetrennt werden. Schließlich erfolgt die gestaffelte, parallele Ausrichtung der Collagenmoleküle zu Fibrillen, die durch intermolekulare, kovalente Bindungen, die über das Enzym Lysyloxidase eingeführt werden, stabilisiert werden [Hulmes, 2008]. Collagen, das während der Synthese unzureichend hydroxyliert wurde, hat eine geringere thermische Stabilität als das normale Protein. Dies liegt darin begründet, dass Hydroxyprolin in der Lage ist, durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Strängen die Tripelhelix zu stabilisieren. Daher treten

durch ungenügende Hydroxilierung abnorme Fasern auf, die für eine geringere mechanische Festigkeit des Gewebes sorgen, die bei dem Krankheitsbild Skorbut, das durch Vitamin C-Mangel ausgelöst wird, deutlich in Erscheinung tritt [Stryer, 1996].

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass die Prozessierung von Procollagen zu Collagen ein extrazelluläres Ereignis ist. Aktuelle Studien legen nahe, dass sowohl die Prozessierung als auch die Zusammenlagerung zu Fibrillen bereits in den Vesikeln während des Transports vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran stattfinden können [Hulmes, 2008]. Es ist derzeit nicht genau bekannt, wie in diesem Prozess der hohe Ordnungszustand der Collagenfibrillen gewährleistet wird. Es wird vermutet, dass die Zellen hier kontrollierenden Einfluss nehmen. Es existieren zwei unterschiedliche Hypothesen bezüglich des Aneinanderlagerns und der Organisation des Collagens *in vivo*. Gemäß der älteren Theorie, die durch zahlreiche experimentelle Daten untermauert wird, stoßen die Fibroblasten das produzierte Collagen als einzelne Moleküle in langgestreckten Oberflächenkrypten aus, wo sie zu Fibrillen assoziieren und in den extrazellulären Raum entlassen werden [Ruberti und Zieske, 2008; Birk und Trelstad, 1984]. Die zweite These besagt, dass die Zellen die Fibrillogenese vermitteln, indem sie die lokale Konzentration und Orientierung der Collagenmoleküle kontrollieren, die dann aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften zunächst cholesterische flüssigkristalline Bereiche ausbilden, die in die organisierte extrazelluläre Matrix umgewandelt werden [Ruberti und Zieske, 2008; Giraud-Guille, 1992].

Auf dem Gebiet der azellulären, biosynthetischen Corneae, die erst eine Besiedlung mit cornealen Zellen *in vivo* vorsehen, konnten bereits erste klinische Erfolge erzielt werden in Form einer klinischen Studie zur Transplantation eines partiellen Stromaersatzes [Fagerholm et al., 2010, 2014]. Aber auch für diese Modelle sind weitere grundlegende Untersuchungen hinsichtlich verbesserter Materialien und Techniken sowie vertiefte präklinische Forschung und weitere klinische Studien zur Wirksamkeit und Sicherheit an einem größeren und breiteren Patientenkollektiv erforderlich, damit biosynthetische Cornea als akzeptierte Alternative zu humanen Spenderhornhäuten eingesetzt werden können [Lagali et al., 2011].

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Stimulation der Collagensynthese sowohl in nativen als auch in immortalisierten humanen cornealen stromalen Zellen vergleichend betrachtet. Durch Langzeitkultivierung unter Supplementierung mit Vitamin C konnten aus beiden Zellarten zusammenhängende Zellsheets erzeugt und charakterisiert werden. Diese Zellsheets haben strukturell große Ähnlichkeit mit dem Stromagewebe während der embryonalen Entwicklung und werden deshalb als ein aussichtsreicher Ansatz für die Generierung eines stromalen Gewebeersatzes angesehen [Cintron et al., 1983; Ruberti und Zieske, 2008]. Das collagene Netzwerk des Stromas wird während der embryonalen Entwicklung von mesenchymalen Zellen gebildet. Dabei entstehen zunächst Strukturen, bei denen die Zellen dicht aneinandergelagert sind. Durch die sukzessive Sekretion von Matrixbestandteilen in den Extrazellularraum driften die Zellen allmählich auseinander. Da sich die Zellen initial in großer Nähe zueinander befinden, wird ein Einfluss der Zellkommunikation auf die Organisation der Zellen und damit der deponierten Extrazellulärmatrix vermutet [Ruberti und Zieske, 2008].

### 5.2.1 Charakterisierung der Langzeitkulturen

Vitamin C ist ein essentieller Co-Faktor für die Hydroxilierung von Prolin und Lysin zu Hydroxyprolin bzw. Hydroxylysin, die wesentliche Bausteine des Collagenmoleküls darstellen. Prolin und Hydroxyprolin, die zusammen etwa 20% der Aminosäuren des Collagenmoleküls ausmachen, stabilisieren die Struktur der einzelnen Peptidschrauben durch die sterische Abstoßung ihrer Pyrrolidinringe. Weiterhin erhöht Hydroxyprolin die Stabilität der Tripelhelix durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den drei Einzelsträngen. Über die Seitenketten des Hydroxylysins oder des Lysins werden mittels Lysyloxidase intermolekulare kovalente Bindungen zwischen verschiedenen Tripelhelizes geknüpft [Hulmes, 2008; Stryer, 1996]. Auf diese Weise ist Vitamin C in der Lage, die Collagendeposition, u.a. in Kulturen humaner cornealer Stromazellen, zu steigern [Newsome et al., 1974; Stoesser et al., 1978; Ruggiero et al., 1996; Guo et al., 2007].

In der vorliegenden Studie wurden native und immortalisierte humane corneale Stromazellen über mehrere Wochen ohne ein Passagieren der Kulturen betrachtet, und der Einfluss der Vitamin C-Supplementierung wurde evaluiert. Zu diversen Zeitpunkten während der Kultivierung wurden zunächst der Collagengehalt, die Zellzahl und die Zellviabilität ermittelt. Es wurde dabei festgestellt, dass die Vitamin C-Zugabe zum Kulturmedium in den nativen HuFib-Zellen eine deutliche Steigerung des Collagengehalts der Kulturen verursachte. Weiterhin wurden die Viabilität und die Proliferation der HuFib-Zellen angeregt. Ein proliferationsfördernder Effekt von Vitamin C wurde zuvor bereits für Zellkulturen von humanen dermalen Fibroblasten, der 3T6-Mausfibroblastenzelllinie und bovinen Gefäßmuskelzellen beschrieben [Levene und Bates, 1975; Hata und Senoo, 1989; Schwartz et al., 1982]. Im Falle der immortalisierten HCK-Zellen wird bereits bei der Kultivierung im Standardmedium, das eine geringe Menge Vitamin C enthält, eine merkliche Menge Collagen gebildet. Aber auch in diesen Kulturen vermag die Supplementierung des Kulturmediums mit Vitamin C, die Collagensynthese zu stimulieren. Anders als bei den HuFib-Zellen verursacht das Vitamin in den HCK-Zellen keine messbare Zunahme der Zellproliferation und der Zellviabilität. Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass es sich bei der immortalisierten HCK-Zelllinie ohnehin um hochproliferative und sehr stoffwechselaktive Zellen handelt, sodass die weitere Supplementierung des Kulturmediums mit Vitamin C keine messbare Stimulation hervorruft. Zu bedenken ist an dieser Stelle ebenfalls, dass das Standardmedium der HCK-Zellen bereits eine geringe Menge Vitamin C enthält, was die Beurteilung eines möglichen Effekts von Vitamin C weiter erschwert. Der absolute Collagengehalt der mit Vitamin C stimulierten Kulturen war für die HuFib- und HCK-Zellen etwa gleich groß. Erst durch die Normierung des Collagengehalts auf die Zellzahl der jeweiligen Kultur wurde deutlich, dass die Collagensyntheseleistung der HuFib-Zellen deutlich ausgeprägter ist als bei den HCK-Zellen. Ein weiterer Unterschied der beiden Zellarten bestand in dem Einfluss der Zellpassage auf die Collagensyntheseleistung und das Ansprechen der Kulturen auf den Vitamin C-Zusatz zum Kulturmedium. Die HCK-Zellen zeigten über einen breiten Passagebereich eine weitgehend gleichbleibende

Collagendeposition. Demgegenüber war bei den HuFib-Zellen bereits nach wenigen Passagen ein merklicher Alterungseffekt feststellbar, der sich in einer allgemein verminderten Collagensynthese und einem geringeren Ansprechen auf die Vitamin C-Supplementierung widerspiegelte. Diese Beobachtung ist möglicherweise mit dem generellen Alterungsprozess der HuFib-Zellkulturen in Verbindung zu bringen, da von primären Zellen bekannt ist, dass sie bereits nach einer begrenzten Anzahl von Passagen in die Seneszenz übergehen, da die Telomere an den DNA-Strängen sich so sehr verkürzt haben, dass eine weitere Zellteilung nicht erfolgen kann, bevor schließlich der Zelltod eintritt. Transformierte Zellen dagegen exprimieren häufig das Enzym Telomerase, das in der Lage ist, die terminalen DNA-Sequenzen in den Telomeren zu replizieren und damit den Lebenszyklus der Zelle zu verlängern [Freshney, 2005].

Des Weiteren wurde der Einfluss der Zellart und der Vitamin C-Supplementierung auf den Gehalt der Glykosaminoglykane in den Kulturen betrachtet. Da zuvor für den Collagengehalt der HuFib-Kulturen ein deutlicher Einfluss der Höhe der Zellpassage festgestellt worden war, wurden die Experimente nur an einer niedrigen Passage der nativen Stromazellen durchgeführt, die wiederum zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten untersucht wurde. Entsprechend wurde für die HCK-Zellen ebenfalls nur eine Zellpassage für die Untersuchung herangezogen. Bei den HuFib-Kulturen wurde bei der Vitamin C-Zugabe zum Kulturmedium ein erhöhter Gehalt der Glykosaminoglykane ermittelt. Allerdings konnte dieser Effekt auf die durch Vitamin C-Supplementierung stimulierte Proliferation der HuFib-Zellen zurückgeführt werden, indem eine Normierung des Glykosaminoglykangehalts auf die Zellzahl vorgenommen wurde. Auch für die Langzeitkulturen der HCK-Zellen konnte kein signifikanter Einfluss des Vitamin C-Zusatzes auf den Glykosaminoglykangehalt festgestellt werden. Anders als beim Collagen sorgte das Vitamin also hinsichtlich der Glykosaminoglykane nicht für eine gesteigerte Syntheseleistung der Zellen. Ren et al. konnten unter serumhaltigen Kultivierungsbedingungen humaner cornealer Fibroblasten mit Vitamin C-Zusatz verschiedene Proteoglykane, darunter die kleinen leucinreichen Proteoglykane Lumican, Mimecan und Decorin, nachweisen [2008]. In dieser Studie erfolgte allerdings keine

vergleichende Kultivierung ohne Vitamin C-Zusatz und die Zellzahl in den Kulturen wurde während der mehrwöchigen Kultivierung nicht parallel bestimmt. Du et al. konnten bei serumfreier Kultivierung humaner cornealer Keratozyten die Expression von Keratocan über Western Blot detektieren, wobei serumhaltig kultivierte Fibroblasten, die als Referenz eingesetzt wurden, keine entsprechende Keratocan-Bande aufwiesen [2007]. Mittels quantitativer Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion konnte in dieser Studie ebenfalls gezeigt werden, dass die Messenger-RNA für Keratocan in den Keratozyten gegenüber den Fibroblasten signifikant hochreguliert war. Musselmann et al. konnten an bovinen cornealen Keratozyten bei viertägiger serumfreier Kultivierung mittels Western Blot und einer Normierung der Pixeldichte der Banden auf den DNA-Gehalt der Kulturen für Vitamin C eine Zunahme des Gehalts an Keratocan im Kulturmedium feststellen [2006]. Gleichzeitig wurde ermittelt, dass die Sekretion des Keratansulfat-Proteoglykans Prostaglandin D-Synthase durch die Vitamin C-Supplementierung nicht beeinflusst wurde. Für das ebenfalls keratansulfatkettenträgende Lumican wurde lediglich ein nicht signifikanter Anstieg infolge des Vitamin C-Zusatzes gemessen, der erst durch die zusätzliche Supplementierung mit Insulin Signifikanz zeigte. Die Autoren schlussfolgerten, dass die Akkumulation von Proteoglykanen, die mit der Tripelhelix des Collagens interagieren, wie Keratocan und Lumican, zum Teil von der Collagensynthese und der Hydroxilierung der Tripelhelix abhängt und damit durch Vitamin C-Zusatz beeinflusst werden kann. Dieses Ergebnis steht nicht im Widerspruch zum Resultat der Messungen der vorliegenden Studie, denn zum einen geht aus der Studie von Musselmann et al. hervor, dass nicht alle Proteoglykane gleichermaßen auf das Vorhandensein von Vitamin C reagieren und zum anderen wird Keratocan, für das Musselmann et al. ein Ansprechen auf den Vitamin C-Zusatz gefunden haben, als Keratozyten-Marker nur in großer Menge vom Keratozyten-Phänotyp synthetisiert, der bei cornealen Stromazellen nativen Ursprungs nur unter serumfreien Kultivierungsbedingungen aufrechterhalten werden kann.

Hinsichtlich der Verwendung von Vitamin C zur Stimulation der Collagendeposition in Zellkulturen ist festzuhalten, dass das Vitamin unter den Kulturbedingungen weitgehend



instabil ist, sodass es nicht kontinuierlich für die Stimulation der Collagensynthese zur Verfügung steht [Peterkofsky, 1972; Levene und Bates, 1975]. Vitamin C wird im Zellkulturmedium bei den Kultivierungsbedingungen von 37°C leicht oxidiert und erhält daher seine Aktivität lediglich über etwa 24 Stunden aufrecht [Hata und Senoo, 1989]. Durch die Verwendung von stabileren Vitamin C-Derivaten, wie L-Ascorbinsäure-2-Phosphat oder 2-O- $\alpha$ -D-Glucopyranosyl-L-Ascorbinsäure, kann eine länger anhaltende Stimulation der Collagensynthese erreicht werden [Hata und Senoo, 1989; Yamamoto et al., 1992; Kumano et al., 1998; Saika, 1992; Saika et al., 1992]. Nach 7 Tagen im Kulturmedium bei 37°C verbleiben etwa 85% von L-Ascorbinsäure-2-Phosphat in der nicht oxidierten Form, sodass die Aktivität des Vitamin-Derivats über den gesamten Zeitraum aufrechterhalten wird [Hata und Senoo, 1989]. Die Beständigkeit von 2-O- $\alpha$ -D-Glucopyranosyl-L-Ascorbinsäure geht sogar noch geringfügig darüber hinaus [Kumano et al., 1998].

### 5.2.2 Nachweis von exprimierten Collagentypen

In cornealen stromalen Zellkulturen, die mit Vitamin C oder dessen stabileren Derivaten stimuliert wurden, konnten neben dem in der Cornea am häufigsten vorkommenden Collagen Typ I auch die Typen V und VI detektiert werden [Ruggiero et al., 1996; Guo et al., 2007; Du et al., 2007]. Das Vorkommen von Collagen Typ III konnte in stromalen Zellkulturen des Fibroblasten- und mehr noch des Myofibroblasten-Phänotyps nachgewiesen werden [Funderburgh et al., 2003; Karamichos et al., 2010].

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurde zunächst auf das Vorhandensein von Collagen Typ I geprüft, um die Ergebnisse der Picrosirius-Red-Färbung zu untermauern. Außerdem konnte durch die Immunfluoreszenzfärbung des in der Cornea dominierenden Collagentyps visuell die Lokalisation und Ausrichtung der Fibrillen beurteilt werden. Darüber hinaus wurde die Präsenz von Collagen Typ III untersucht, da dieser Collagentyp von den Reparatur-Phänotypen der cornealen Stromazellen exprimiert wird, die durch serumhaltige Kultivierung induziert werden.

Durch die gelelektrophoretische Untersuchung der Proben mit gleichem Gesamtproteingehalt konnte das Ergebnis der auf die Zellzahl normierten Picrosirius-Red-Färbung bestätigt werden, da das erhaltene Bandenmuster des Collagen Typ I, das in allen Proben erkennbar war, die gleiche Abstufung in der Intensität zeigte wie der kolorimetrische Assay hinsichtlich der Collagensyntheseleistung der beiden Zellarten jeweils mit und ohne Vitamin C-Zusatz zum Kulturmedium. Die HuFib-Zellen, insbesondere unter Vitamin C-Supplementierung, wiesen einen höheren Collagenanteil im Gesamtproteingehalt auf als die HCK-Zellen. Wegen der insgesamt geringen Bandenintensität und dem speziellen gelelektrophoretischen Verhalten von humanem Collagen Typ III konnte dessen Vorhandensein in diesem Experiment nicht beurteilt werden.

Im Western Blot-Experiment konnte Collagen Typ I für die HuFib-Zellen ohne Zusatz von Vitamin C aufgrund des geringen Proteingehalts der Probe, der bei der zugehörigen SDS-PAGE deutlich erkennbar war, nicht identifiziert werden. In den übrigen Kulturen war der Nachweis positiv. Hingegen konnte mittels Immunfluoreszenzfärbung das Vorhandensein von Collagen Typ I in allen Kulturen bestätigt werden. Die Immunfluoreszenzfärbung von Collagen Typ I nach dreiwöchiger Kultivierung konnte darüber hinaus für die HuFib-Zellen die Längsorientierung der Collagenfibrillen veranschaulichen.

Collagen Typ III konnte in den HCK-Kulturen weder durch Western Blot noch durch Immunfluoreszenz eindeutig nachgewiesen werden. Das Ergebnis des Western Blots könnte durch den insgesamt niedrigen Collagengehalt dieser Proben bedingt sein. Für die Detektion mittels Immunfluoreszenz, die keinen vorherigen Aufschluss der Kulturen und ein Lösen der Collagene erforderte, wäre allerdings ein deutlich positiver Nachweis zu erwarten gewesen, vergleichbar mit dem der HuFib-Zellen, wenn der negative Befund des Western Blots allein auf die geringe Probenkonzentration zurückzuführen wäre. Daher sind die vorliegenden Ergebnisse eher hinsichtlich einer Konservierung des Keratozyten-Phänotyps in den HCK-Zellen zu deuten. Für die HuFib-Zellen konnte Collagen Typ III für die Kultivierung mit und ohne Vitamin C-Supplementierung identifiziert werden. Einzig der Nachweis für die HuFib-Kulturen ohne Vitamin C-Zusatz war mittels Western Blot, wiederum durch den niedrigen

Proteingehalt der Probe, nicht möglich. Dieses Ergebnis der nativen Zellen bestätigt ihren Fibroblasten-Phänotyp. Insgesamt zeigte die Immunfluoreszenz eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der SDS-PAGE und der Western-Blot-Analytik.

### 5.2.3 Charakterisierung der Zellsheets

Durch die Langzeitkultivierung der beiden stromalen Zellarten mit Vitamin C-Zusatz konnten ablösbare Zellsheets erzeugt werden, die robust genug waren, um für weitere Charakterisierungen eingesetzt zu werden. Der Zeitpunkt der Ablösbarkeit eines zusammenhängenden Zellrasens wies dabei eine Korrelation zum zuvor ermittelten Collagengehalt der Kulturen auf. Die Kultivierung der HCK-Zellen ohne Vitamin C-Zusatz zeigte, dass bei der Bestimmung des Collagengehalts mittels Picrosirius Red-Assay berücksichtigt werden muss, dass ein adäquater Hydroxylierungsgrad des Collagens unbeachtet bleibt, da bei diesen Kultivierungsbedingungen der gemessene Collagengehalt eine im Vergleich zu den Vitamin C-haltigen Kulturen adäquate Höhe erreicht hatte, aber eine weitere Untersuchung dieser Kulturen aufgrund ihrer geringen mechanischen Stabilität nicht möglich war.

Bei der weiteren Untersuchung der Eigenschaften der cornealen Zellsheets wurde festgestellt, dass die Zellsheets aus den nativen HuFib-Zellen eine höhere Lichttransmission sowie bessere biomechanische Kennzahlen zeigen und damit eine größere Ähnlichkeit mit dem nativen Gewebe aufweisen als die Zellsheets der HCK-Zellen. Vermutlich werden diese Eigenschaften durch die Zellzahl innerhalb der Kulturen, den Ordnungsgrad der extrazellulären Matrix sowie das Verhältnis von extrazellulärer Matrix zur Zellzahl beeinflusst. Die rasterelektronenmikroskopische Betrachtung der cornealen Zellsheets deutete an, dass das Maß an Ordnung der Collagenfibrillen bei den Zellsheets aus nativen Stromazellen eine deutlichere Ausprägung besaß. Durch die Zellzählung und die Bestimmung des Collagengehalts während der Langzeitkultivierung wurde festgestellt, dass die Zellzahl in den HuFib-Zellsheets deutlich geringer war und das Verhältnis des Collagengehalts zur Menge inkorporierter Zellen entsprechend höher lag. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht

evaluiert werden, wie der relative Beitrag von Zellzahl, dem Verhältnis von extrazellulärer Matrix zu Zellzahl und der Matrixorganisation zur Lichttransmission und den biomechanischen Eigenschaften der cornealen stromalen Zellsheets ist.

Im Vergleich zu den cornealen Zellsheets zeigten die entsprechenden dermalen Kulturen, die eine größere Dicke aufwiesen, eine deutlich erniedrigte Lichttransmission. Bei den rasterelektronischen Aufnahmen war neben dem etwas höheren Fibrillendurchmesser ein geringerer Ordnungsgrad erkennbar. Hinsichtlich der biomechanischen Eigenschaften waren Unterschiede zu den cornealen Zellsheets feststellbar, die vermutlich auf die unterschiedliche Zusammensetzung und Ordnungsstruktur von cornealem und dermalem Gewebe zurückzuführen sind.

Die Stimulation von humanen cornealen stromalen Zellen zur Sekretion collagenhaltiger extrazellulärer Matrix induziert durch Vitamin C oder stabilere Vitamin C-Derivate führt zu Zellsheets mit hoher Zelldichte [Guo et al., 2007; Ren et al., 2008; Wu et al., 2012]. Unter serumfreien Kulturbedingungen mit Zusatz von Vitamin C oder Derivaten konnten ebenfalls die im nativen Gewebe vorkommenden Collagentypen nachgewiesen werden [Du et al., 2007]. Die Generierung von Zellsheets unter serumfreien Kultivierungsbedingungen wurde aber bisher nicht beschrieben. Zellsheets ähneln morphologisch der Matrix in vivo während der embryonalen Entwicklung und werden daher als ein aussichtsreicher Ansatz für die In-vitro-Rekonstruktion stromalen Gewebes mittels Zellkulturtechniken betrachtet [Cintron et al., 1983; Ruberti und Zieske, 2008]. Die so synthetisierten Collagenfibrillen zeigen allerdings nur partiell eine organisierte Anordnung und sind eher polydispers. Bisher ist es nicht gelungen, die stromalen Zellen in vitro dazu zu stimulieren, nicht nur lokal, sondern flächig geordnete extrazelluläre Matrix zu synthetisieren. Da stromale Zellen in vitro dazu tendieren, sich in orthogonale Schichten anzuordnen und die Collagendeposition der Orientierung der Zellen folgt, wäre es für eine mögliche weiterführende Untersuchung an Zellsheets sinnvoll, die Zellorientierung durch Mikrostrukturierungen oder mechanische Belastung der Kultivierungsoberfläche zu unterstützen [Newsome et al., 1974; Doane und Birk, 1991; Wang et al., 2003]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass sich corneale

stromale Zellen auf verschiedenen Materialien entlang der Achse von Mikrostrukturierungen in der Kultivierungsoberfläche anordnen [Guillemette et al., 2009; Koo et al., 2011]. Dabei scheint der Abstand der Mikrofurchen von größerer Bedeutung zu sein als die Eigenschaften des eingesetzten Materials [Koo et al., 2011].

Eine Ausrichtung der Zellen kann auch durch die Verwendung von Kultivierungssubstraten, die aus geordneten Fasern bestehen, erreicht werden [Wu et al., 2012; Builles et al., 2010]. Wu et al. konnten kürzlich zeigen, dass der Erhalt des Keratozyten-Phänotyps, durch serumfreie Kultivierungsbedingungen, allein nicht ausreichend ist, um stromales Gewebe mit einer allseitig ausgeprägten Ordnungsstruktur zu erhalten [2012]. In dieser Studie wurden humane corneale Keratozyten auf einem Substrat aus Polyesterurethancarbamid unter Vitamin C-Supplementierung kultiviert, um die Deposition von extrazellulärer Matrix zu stimulieren. Das Substrat bestand dabei aus parallel ausgerichteten oder zufällig angeordneten Polyesterurethancarbamid-Fasern oder aus dem Material wurde ein Film gegossen. Dabei bewirkte nur das Substrat aus parallel ausgerichteten Fasern eine entsprechende Ausrichtung der Keratozyten und die Bildung einer organisierten Struktur aus Collagenfibrillen mit einem einheitlichen Durchmesser und einem regelmäßigen Fibrillenabstand. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass eine mechanische Belastung einer collagenhaltigen Kultivierungsmatrix das Verhalten von humanen cornealen Fibroblasten innerhalb der Matrix beeinflusst, sodass ein höheres Maß an paralleler Ausrichtung von Collagenfibrillen und Zellen erreicht wird [Karamichos et al., 2007]. Während sich die Fibroblasten in einer unter mechanischer Spannung befindlichen Matrix entlang dieser Kraftachse anordneten, sich streckten und das Collagen entlang der Kraftachse verdichteten, zeigten die cornealen Fibroblasten in einer entspannten Matrix eine rein zufällige Anordnung und erschienen weniger gestreckt.

Die durch Vitamin C-Supplementierung entstandenen Zellsheets waren im Falle der HCK-Zellen bis zu 60 µm dick, während die HuFib-Zellsheets lediglich eine Dicke bis etwa 25 µm aufwiesen. Damit sind diese Zellsheets etwa um den Faktor 10-20 dünner als das native humane corneale Stroma. Um ein Stromabioäquivalent mit einer dem nativen Gewebe

entsprechenden Dicke zu erhalten, wäre es erforderlich, mehrere dieser Zellsheets übereinander zu stapeln, wie schon von Guo et al. vorgeschlagen wurde, nachdem sie Zellsheets mit einer Dicke von 36 µm erzeugt hatten [2007]. Die Kultivierung von übereinandergelegten Zellsheets wurde bereits von der Forschergruppe um Germain und Auger durchgeführt [Carrier et al., 2008, 2009; Proulx et al., 2010]. Sie kombinierten je ein dermales und ein corneales Zellsheet zum Aufbau einer stromalen Matrix, die die Co-Kultivierung von differenziertem Epithel und Endothel ermöglichte. Das Stapeln der Zellsheets könnte neben dem Zugewinn an Materialdicke außerdem die biomechanischen Eigenschaften der Zellsheet verbessern, um schließlich eine dem nativen Gewebe ähnliche Festigkeit zu erreichen. Die Zugfestigkeit der humanen Cornea, bestimmt über eine Zugprüfung, liegt bei etwa 19 MPa [Bryant et al., 1994]. Für die In-vitro-Messung des E-Moduls von humaner Cornea ergeben sich stark variierende Werte zwischen 0,1-57 MPa, die vermutlich auf die unterschiedlichen Testmethoden zurückzuführen sind, die für die Bestimmung eingesetzt wurden [Hamilton und Pye, 2008; Wollensak et al., 2003d].

### **5.2.4 Fazit zur Generierung von Zellsheets aus humanen cornealen stromalen Zellen**

Die Langzeitkultivierung humaner cornealer Stromazellen mit Vitamin C-Supplementierung führt zu Zellsheets, die aufgrund ihrer Zusammensetzung und ihrer biomechanischen Eigenschaften für die Erzeugung eines transplantierbaren, in vitro generierten Stromaersatzes geeignet erscheinen. Hinsichtlich der notwendigen Weiterentwicklung müsste in weiterführenden Untersuchungen evaluiert werden, ob ein Zusammenführen mehrerer übereinandergestapelter Zellsheets mit ausreichender Haftung aneinander möglich ist und ob dadurch, neben der erforderlichen Dicke, die für eine Transplantation und die spätere Gewebefunktionalität notwendige biomechanische Festigkeit erreicht wird. Dabei sollten die guten optischen Eigenschaften der Zellsheets erhalten bleiben. Daher wäre es erstrebenswert, die parallele Anordnung der Collagenfibrillen innerhalb eines Zellsheets zu

fördern. Außerdem sollte das Stapeln in Analogie zum nativen Gewebe so erfolgen, dass die Ausrichtung der Collagenfibrillen in benachbarten Zellsheets alterniert.

Obwohl die immortalisierten HCK-Zellen im Gegensatz zu den nativen Zellen nicht mit einer deutlichen Steigerung der Collagenproduktion auf die Stimulation mit Vitamin C reagiert haben, könnten sie sich dennoch in einem In-vitro-Modell vorteilhaft erweisen, da die Standardisierbarkeit durch den nur gering ausgeprägten Einfluss der Zellpassage auf die Proliferation und Collagensynthese der Zelllinie erleichtert wäre. Bei der Untersuchung, ob die Zellsheets durch die Förderung einer einheitlichen Zellausrichtung, z.B. durch mechanische Stimulation oder Mikrostrukturierungen der Kultivierungsoberfläche, eine Optimierung erfahren, könnten zunächst die Zellsheets aus immortalisierten Zellen als In-vitro-Modell eingesetzt werden, um in Vorversuchen Testparameter und Messeinstellungen zu evaluieren und zu prüfen, um damit einen hohen Durchsatz des wertvollen Zellmaterials zu vermeiden, das aus humanem Gewebe isoliert wurde.

Prinzipiell könnte sich ein Transplantat auf Basis von Zellsheets nativer Stromazellen als vorteilhaft erweisen, da es aus den Zellen des Patienten generiert werden könnte, und somit das Risiko einer Transplantatabstoßung sowie das einer Infektionsübertragung vom Spender auf den Empfänger, von denen eine Transplantation allogenen Gewebes begleitet wird, nicht zum Tragen kommen würden. Ein anderes mögliches Anwendungsfeld für Zellsheets aus nativen stromalen Zellen wäre die Rekonstruktion der Augenoberfläche als Alternative zu der sonst meist eingesetzten Amnionmembran, die in Patch-, Graft- oder kombinierter Technik die Abheilung von Epithelschäden fördert und zum Ausgleich von stromalen Substanzdefekten dient. Die biomechanischen Eigenschaften von Zellsheet aus humanen stromalen Zellen sind mit denen der Amnionmembran vergleichbar. Allerdings zeichnen sie sich im Vergleich zur Amnionmembran durch eine höhere Lichttransmission im sichtbaren Wellenlängenbereich aus [Reichl et al., 2011].

## 6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zum einen ein bestehendes Cornea-Konstrukt für In-vitro-Arzneistoffabsorptionsuntersuchungen hinsichtlich der Verwendung einer immortalisierten Keratozyten-Zelllinie weiterzuentwickeln und eine Verbesserung der biomechanischen Eigenschaften des Konstruktes herbeizuführen. Zum anderen sollten grundlegende Untersuchungen an stromalen cornealen Zellen bezüglich ihrer Fähigkeit, extrazelluläre Matrix zu sezernieren, durchgeführt werden sowie stromale Zellsheets generiert und charakterisiert werden, um deren Eignung für die Herstellung eines transplantierbaren stromalen Gewebeersatzes zu evaluieren.

Der Einsatz von immortalisierten Zelllinien zum Aufbau von Zellkulturmodellen für In-vitro-Testungen ist wegen ihres weitgehend gleichbleibenden Wachstumsverhaltens über einen weiten Passagebereich vorteilhaft, um eine gute Standardisierbarkeit und Reproduzierbarkeit des Modelles zu ermöglichen. Für den Aufbau eines bestehenden organotypischen Cornea-Konstruktes für In-vitro-Arzneistoffabsorptionsuntersuchungen konnte bereits in vorherigen Untersuchungen die Eignung der epithelialen HCE-T-Zelllinie anstelle der ursprünglich eingesetzten CEPI-Zelllinie gezeigt werden. Darauf weiter aufbauend konnte in der vorliegenden Studie die immortalisierte Keratozytenzelllinie HCK als Ersatz für die zuvor verwendeten nativen cornealen Fibroblasten in das Modell eingeführt werden. Es zeigte sich dabei, dass die Fähigkeit der HCK-Zellen, eine Kontraktion der sie umgebenden Collagenmatrix herbeizuführen, schwächer ausgeprägt ist als bei den nativen Fibroblasten. Es war eine deutliche Erhöhung der Einsaat der cornealen stromale Zellen erforderlich, um das Ausmaß der Kontraktion des Konstruktes während der Kultivierungsperiode beizubehalten. Das Kultivierungsprotokoll des Konstruktes konnte nicht auf die Verwendung eines einzigen Mediums reduziert werden. Der Zusatz des Supplementes DMSO zum Sasaki-Medium, der für die Epithelzellen unverzichtbar ist für die Ausbildung einer dichten Permeationsbarriere, führte hingegen bei den HENC- und HCK-Zellen zu einem beeinträchtigten Wachstum, sodass ein Mediumwechsel während der Kultivierung weiterhin



erforderlich war. Das Kultivierungsprotokoll konnte allerdings dahingehend optimiert werden, dass durch eine Modifikation des Aufbaus vermehrte Zeit für die Kontraktion eingeräumt werden konnte, bei einer gleichzeitig verkürzten Gesamtkultivierungsdauer des Konstruktes. Darüber hinaus wurde eine Miniaturisierung der nach dem optimierten Kultivierungsprotokoll hergestellten Cornea-Modelle vorgenommen, die die Herstellung einer größeren Anzahl von Konstrukten bei gleichem Materialeinsatz ermöglichte. Der Vergleich histologischer Schnittpräparate konnte zeigen, dass die Modifikation des Konstruktaufbaus und deren miniaturisierte Ausführung ein morphologisch vergleichbares Ergebnis hervorbringen wie das ursprüngliche Kultivierungsprotokoll des Konstruktes.

Die Variation des Konstruktaufbaus erlaubte die Bildung reiner Stromabioäquivalente, die separat einer Verfestigung unterzogen werden konnten. Die Durchführung der Riboflavin/UVA-Behandlung konnte für die Anwendung an Strombioäquivalenten in Zellkulturplatten unter Erhalt der sterilen Kultivierungsbedingungen modifiziert werden. Das Vitamin Riboflavin allein sorgte für keine Beeinträchtigung der Zellkulturen. Erst bei der zusätzlichen UVA-Bestrahlung kam ein deutlicher Schädigungseffekt zum Tragen, der sich in einer von der Bestrahlungsdosis abhängigen, deutlichen und nachhaltigen Verminderung der Zellviabilität innerhalb der Stromabioäquivalente äußerte. Nachgeschaltete Experimente mittels Caspase- und Zytotoxizitätsassay sowie Apoptose-Nekrose-Fluoreszenzfärbung an Monolayerkulturen, die eine vergleichbare Beeinträchtigung der Zellviabilität wie die Strombioäquivalente erfahren hatten, zeigten, dass Apoptose oder Nekrose je nach Höhe der applizierten Bestrahlungsdosis vorherrschten. Durch die gelelektrophoretische Untersuchung und die oszillationsrheologische Betrachtung der viskoelastischen Eigenschaften der Stromabioäquivalente konnte eine durch die Riboflavin/UVA-Methode hervorgerufene Quervernetzung der Collagenfibrillen bestätigt werden. Der erzielte Verfestigungseffekt war allerdings gering, sodass die Handhabbarkeit der Stromabioäquivalente nicht wesentlich verbessert wurde.

HCK-Zellen konnten erfolgreich in das Cornea-Konstrukt für In-vitro-Arzneistoffabsorptionsuntersuchungen etabliert werden. Allerdings stellt die Riboflavin/UVA-

Methode aufgrund ihres zellschädigenden Effektes und der geringen Verbesserung der biomechanischen Eigenschaften keine geeignete Methode dar, um die Festigkeit der collagenen Stromabiomatrix des Cornea-Konstruktes zu erhöhen.

Der zweite Themenkomplex dieser Arbeit untersuchte detailliert die Stimulation der Sekretion extrazellulärer Matrix in stromalen cornealen Zellen nativen Ursprungs und einer immortalisierten Zelllinie durch Supplementierung mit Vitamin C in Langzeitkulturen. Dafür wurden die beiden Zellarten vergleichend mit oder ohne den Zusatz von Vitamin C kultiviert. Vitamin C war in der Lage, in beiden Zellarten eine Erhöhung der Collagenmenge der extrazellulären Matrix hervorzurufen, wobei dieser stimulierende Effekt in den HuFib-Zellen eine deutlichere Ausprägung besaß. In diesen Zellen wurde darüber hinaus eine Stimulation der Zellproliferation verbunden mit einer Erhöhung der Zellviabilität der Kulturen infolge des Vitamin C-Zusatzes festgestellt. Allerdings konnte in den stromalen Zellen nativen Ursprungs das gute Ansprechen auf die Vitamin C-Supplementierung nur über wenige Passagen aufrechterhalten werden, bevor ein rascher Alterungseffekt einsetzte. Demgegenüber zeigten die HCK-Zellen über einen breiten Passagebereich ein konstantes Ansprechen auf die Stimulation der Collagensekretion. Mittels Immunfluoreszenzfärbung und SDS-PAGE in Kombination mit Western Blot-Analytik konnte für beide Zellarten Collagen Typ I nachgewiesen werden, der den Großteil des Collagens im nativen Stromagewebe ausmacht. In den HuFib-Zellen konnte außerdem Collagen Typ III nachgewiesen werden, der in vivo von den stromalen Reparaturphänotypen, die eine große Menge extrazellulärer Matrix synthetisieren können, gebildet wird. In den HCK-Zellen konnte dieser Collagentyp nicht nachgewiesen werden. Dieser Befund könnte, ebenso wie die verminderte Kontraktionsfähigkeit, auf eine Konservierung von Eigenschaften des Keratozyten-Phänotyps in dieser Zelllinie hindeuten.

Neben Collagen wurden Glykosaminoglykane, die elementare Bausteine der Proteoglykane darstellen, als weitere Bestandteile der extrazellulären Matrix der Langzeitkulturen über den Zeitraum der Kultivierung quantifiziert. Vitamin C verursachte keine Stimulation der

Glykosaminoglykansekretion. Ihr mengenmäßiges Ansteigen in den Vitamin C-haltigen Kulturen ist lediglich Ausdruck einer ansteigenden Zellzahl.

Durch die mehrwöchige Vitamin C-Supplementierung des Kulturmediums konnten aus beiden Zellarten ablösbare Zellsheets generiert werden, die einer weiteren Charakterisierung zugänglich waren. Die HCK-Zellsheets waren zu einem früheren Zeitpunkt ablösbar und besaßen gleichzeitig eine ausreichende Stabilität für charakterisierende Untersuchungen. Außerdem wiesen sie im Kryomikrotom-Querschnitt eine größere Dicke auf. Dennoch waren die HuFib-Zellsheets ihnen insgesamt überlegen hinsichtlich der Lichttransmission, des Elastizitätsmoduls und der Zugfestigkeit. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen konnten für beide Zellarten die ausgeprägte fibrilläre Struktur der extrazellulären Matrix illustrieren. Hinsichtlich des Fibrillendurchmessers konnte kein Unterschied festgestellt werden. Allerdings schien der Ordnungsgrad in den HuFib-Zellsheets eine deutlichere Ausprägung zu besitzen. Vergleichende Untersuchungen an Zellsheets aus humanen dermalen Fibroblasten zeigten, dass diese sich durch eine geringere Transparenz, eine größere Dicke im Kryomikrotom-Querschnitt, dickere Fibrillen der extrazellulären Matrix in einem geringeren Ordnungszustand in der rasterelektronenmikroskopischen Darstellung sowie andere biomechanische Eigenschaften auszeichnen, die vermutlich auf eine andere Zusammensetzung und Anordnung zurückzuführen sind.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten grundlegende Erkenntnisse hinsichtlich der Fähigkeit cornealer stromaler Zellen extrazelluläre Matrix in vitro zu bilden gewonnen werden. Aufgrund der für die HuFib-Zellsheets ermittelten Eigenschaften, die ihre Ähnlichkeit zum nativen Stromagewebe aufzeigen, erscheinen diese als geeignetes Biomaterial für den Aufbau eines transplantierbaren stromalen Gewebeersatzes. Allerdings ist weitere Grundlagenforschung notwendig, da für das Erreichen einer adäquaten Gewebedicke und Festigkeit ein Stapeln mehrerer Zellsheets erforderlich wäre. Zusätzliche Optimierung der Materialeigenschaften könnte über eine Erhöhung der Ordnung der Collagenfibrillen der extrazellulären Matrix erreicht werden. Wegen ihres immortalisierten Status sind HCK-Zellen für eine Transplantation ungeeignet. Im Zuge der Entwicklung eines transplantierbaren

cornealen Stromaersatzes aus nativen Zellen könnten die Zellsheets aus HCK-Zellen aber sinnvoll als ein In-vitro-Modell eingesetzt werden.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abolchamat B, Engelmann K, Böhnke M *et al.* 1999; Morphological and functional analysis of immortalized human corneal endothelial cells after transplantation. *Exp Eye Res* 69: 547–553.
- Albrecht S, Zimmermann T, Distler W. 2005; Hormondiagnostik mit Chemilumineszenz. *Gynäkologe* 38: 295–303.
- Andersson M, Sjöstrand J, Petersen A *et al.* 2000; Caspase and proteasome activity during staurosporin-induced apoptosis in lens epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 2623–2632.
- Araki-Sasaki K, Ohashi Y, Sasabe T *et al.* 1995; An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 614–621.
- Assouline M, Chew SJ, Thompson HW *et al.* 1992; Effect of growth factors on collagen lattice contraction by human keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 1742–1755.
- Atala A, Lanza RP (Hg.). 2002; Methods of tissue engineering. San Diego: Academic Press.
- Ban Y, Cooper LJ, Fullwood NJ *et al.* 2003; Comparison of ultrastructure, tight junction-related protein expression and barrier function of human corneal epithelial cells cultivated on amniotic membrane with and without air-lifting. *Exp Eye Res* 76: 735–743.
- Barraquer J, Rutllan J. 1991; Mikrochirurgie der Kornea. Stuttgart: Ferdinand Enke.
- Bauer KH, Frömming K, Führer C. 2012; Pharmazeutische Technologie. 9. Aufl. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Baum JL, Niedra R, Davis C *et al.* 1979; Mass culture of human corneal endothelial cells. *Arch Ophthalmol* 97: 1136–1140.
- Beales MP, Funderburgh JL, Jester JV *et al.* 1999; Proteoglycan synthesis by bovine keratocytes and corneal fibroblasts: maintenance of the keratocyte phenotype in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 1658–1663.
- Becker U, Ehrhardt C, Daum N *et al.* 2007; Expression of ABC-transporters in human corneal tissue and the transformed cell line, HCE-T. *J Ocul Pharmacol Ther* 23: 172–181.
- Becker U, Ehrhardt C, Schneider M *et al.* 2008; A comparative evaluation of corneal epithelial cell cultures for assessing ocular permeability. *Altern Lab Anim* 36: 33–44.

- Bednarz J. 2001; Effect of three different media on serum free culture of donor corneas and isolated human corneal endothelial cells. *Br J Ophthalmol* 85: 1416–1420.
- Bednarz J, Rodokanaki-von Schrenck A, Engelmann K. 1998; Different characteristics of endothelial cells from central and peripheral human cornea in primary culture and after subculture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 34: 149–153.
- Bednarz J, Teifel M, Friedl P *et al.* 2000; Immortalization of human corneal endothelial cells using electroporation protocol optimized for human corneal endothelial and human retinal pigment epithelial cells. *Acta Ophthalmol Scand* 78: 130–136.
- Bednarz J, Weich HA, Rodokanaki-von Schrenck A *et al.* 1996; Einfluss der Differenzierung auf die Expression von Genen für Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren in humanen kornealen Endothelzellen. *Ophthalmologe* 93: 268–274.
- Bell E, Ivarsson B, Merrill C. 1979; Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 1274–1278.
- Belmokhtar CA, Hillion J, Ségal-Bendirdjian E. 2001; Staurosporine induces apoptosis through both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Oncogene* 20: 3354–3362.
- Benedek GB. 1971; Theory of transparency of the eye. *Appl Opt* 10: 459–473.
- Berridge MV, Horsfield JA, Tan AS. 1995; Evidence that cell survival is controlled by interleukin-3 independently of cell proliferation. *J Cell Physiol* 163: 466–476.
- Berridge MV, Tan AS. 1993; Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 303: 474–482.
- Berridge MV, Tan AS. 1998; Trans-plasma membrane electron transport: a cellular assay for NADH- and NADPH-oxidase based on extracellular, superoxide-mediated reduction of the sulfonated tetrazolium salt WST-1. *Protoplasma* 205: 74–82.
- Berridge MV, Tan AS, McCoy KD *et al.* 1996; The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica*: 14–19.
- Berryhill BL, Kader R, Kane B *et al.* 2002; Partial restoration of the keratocyte phenotype to bovine keratocytes made fibroblastic by serum. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 3416–3421.

- Bertrand R, Solary E, O'Connor P *et al.* 1994; Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. *Exp Cell Res* 211: 314–321.
- Birk DE, Fitch JM, Babiarz JP *et al.* 1990; Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *J Cell Sci* 95 (Pt 4): 649–657.
- Birk DE, Fitch JM, Linsenmayer TF. 1986; Organization of collagen types I and V in the embryonic chicken cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 1470–1477.
- Birk DE, Trelstad RL. 1984; Extracellular compartments in matrix morphogenesis: collagen fibril, bundle, and lamellar formation by corneal fibroblasts. *J Cell Biol* 99: 2024–2033.
- Böhnke M, Eggli P, Engelmann K. 1999; Transplantation of cultured adult human or porcine corneal endothelial cells onto human recipients in vitro. Part II: Evaluation in the scanning electron microscope. *Cornea* 18: 207–213.
- Boozchaloo S, Reichl S. 1996; Charakterisierung verschiedener Kollagene durch Gelelektrophorese. Seminararbeit. TU Braunschweig, Braunschweig. Institut für Pharmazeutische Technologie.
- Borcherding MS, Blacic LJ, Sittig RA *et al.* 1975; Proteoglycans and collagen fibre organization in human corneoscleral tissue. *Exp Eye Res* 21: 59–70.
- Borrelli M, Reichl S, Feng Y *et al.* 2013; In vitro characterization and ex vivo surgical evaluation of human hair keratin films in ocular surface reconstruction after sterilization processing. *J Mater Sci: Mater Med* 24: 221–230.
- Bradford MM. 1976; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.
- Brandenburger T, Bajorat T. 2006; Fallbuch Biochemie: Thieme Georg Verlag.
- Bryant MR, Szerenyi K, Schmotzer H *et al.* 1994; Corneal tensile strength in fully healed radial keratotomy wounds. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 3022–3031.
- Builles N, Janin-Manificat H, Malbouyres M *et al.* 2010; Use of magnetically oriented orthogonal collagen scaffolds for hemi-corneal reconstruction and regeneration. *Biomaterials* 31: 8313–8322.
- Carlsson DJ, Li F, Shimmura S *et al.* 2003; Bioengineered corneas: how close are we?. *Curr Opin Ophthalmol* 14: 192–197.
- Carrier P, Deschambeault A, Audet C *et al.* 2009; Impact of cell source on human cornea reconstructed by tissue engineering. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50: 2645–2652.

- Carrier P, Deschambeault A, Talbot M *et al.* 2008; Characterization of wound reepithelialization using a new human tissue-engineered corneal wound healing model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49: 1376–1385.
- Chang JE, Basu SK, Lee VH. 2000; Air-interface condition promotes the formation of tight corneal epithelial cell layers for drug transport studies. *Pharm Res* 17: 670–676.
- Chen B, Jones RR, Mi S *et al.* 2012; The mechanical properties of amniotic membrane influence its effect as a biomaterial for ocular surface repair. *Soft Matter* 8: 8379–8387.
- Cho KS, Lee EH, Choi JS *et al.* 1999; Reactive oxygen species-induced apoptosis and necrosis in bovine corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 911–919.
- Cintron C, Covington H, Kublin CL. 1983; Morphogenesis of rabbit corneal stroma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24: 543–556.
- Cintron C, Hong BS. 1988; Heterogeneity of collagens in rabbit cornea: type VI collagen. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29: 760–766.
- Cintron C, Hong BS, Covington HI *et al.* 1988; Heterogeneity of collagens in rabbit cornea: type III collagen. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29: 767–775.
- Collins JA, Schandi CA, Young KK *et al.* 1997; Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem Cytochem* 45: 923–934.
- Crabb RA, Chau EP, Evans MC *et al.* 2006; Biomechanical and microstructural characteristics of a collagen film-based corneal stroma equivalent. *Tissue Eng* 12: 1565–1575.
- Crouch S, Kozlowski R, Slater K *et al.* 1993; The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods* 160: 81–88.
- Cua AB, Wilhelm K, Maibach HI. 1990; Elastic properties of human skin: relation to age, sex, and anatomical region. *Arch Dermatol Res* 282: 283–288.
- Daoud YJ, Kim T. 2010; Corneal Surgery. In: Trattler B, Majmudar PA, Luchs JI *et al.* (Hg.): Cornea handbook. Thorofare, NJ: SLACK Inc.: 249–268.
- Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X *et al.* 1997; Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* 27: 1–20.
- Decker T, Lohmann-Matthes ML. 1988; A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods* 115: 61–69.



- Deyl Z, Adam M. 1989; Separation methods for the study of collagen and treatment of collagen disorders. *J Chromatogr* 488: 161–197.
- Deyl Z, Miksik I. 2000; Advanced separation methods for collagen parent  $\alpha$ -chains, their polymers and fragments. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 739: 3–31.
- Doane KJ, Babiarz JP, Fitch JM *et al.* 1992; Collagen fibril assembly by corneal fibroblasts in three-dimensional collagen gel cultures: small-diameter heterotypic fibrils are deposited in the absence of keratan sulfate proteoglycan. *Exp Cell Res* 202: 113–124.
- Doane KJ, Birk DE. 1991; Fibroblasts retain their tissue phenotype when grown in three-dimensional collagen gels. *Exp Cell Res* 195: 432–442.
- Döhring S. 2009; Entwicklung und Charakterisierung von organotypischen Cornea-Konstrukten mit unterschiedlichen Epithelien für In-vitro-Permeations- und Zytotoxizitätsuntersuchungen. Dissertation. TU Braunschweig, Braunschweig. Institut für Pharmazeutische Technologie.
- Dolder R, Skinner FS. 1990; Ophthalmika. 4. Aufl. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Dravida S, Gaddipati S, Griffith M *et al.* 2008; A biomimetic scaffold for culturing limbal stem cells: a promising alternative for clinical transplantation. *J Tissue Eng Regen Med* 2: 263–271.
- Du Y, SundarRaj N, Funderburgh ML *et al.* 2007; Secretion and organization of a cornea-like tissue in vitro by stem cells from human corneal stroma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 5038–5045.
- Dua HS, Gomes JA, King AJ *et al.* 2004; The amniotic membrane in ophthalmology. *Surv Ophthalmol* 49: 51–77.
- Dyrlund TF, Poulsen ET, Scavenius C *et al.* 2012; Human cornea proteome: identification and quantitation of the proteins of the three main layers including epithelium, stroma, and endothelium. *J Proteome Res* 11: 4231–4239.
- EEC. 1986; Council directive 86/609/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the member states regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. *Official Journal of the European Union*.
- Elsner P, Wilhelm D, Maibach HI. 1990; Mechanical properties of human forearm and vulvar skin. *Br J Dermatol* 122: 607–614.
- Engelke M, Zorn-Kruppa M, Gabel D *et al.* 2013; A human hemi-cornea model for eye irritation testing: quality control of production, reliability and predictive capacity. *Toxicol In Vitro* 27: 458–468.
- Engelmann K, Bednarz J, Böhnke M. 1999a; Endothelzelltransplantation und Wachstumsverhalten des humanen kornealen Endothels. *Ophthalmologie* 96: 555–562.

- Engelmann K, Bednarz J, Schäfer H *et al.* 2001; Isolation and characterization of a mouse monoclonal antibody against human corneal endothelial cells. *Exp Eye Res* 73: 9–16.
- Engelmann K, Bednarz J, Valtink M. 2004; Prospects for endothelial transplantation. *Exp Eye Res* 78: 573–578.
- Engelmann K, Böhnke M, Friedl P. 1988; Isolation and long-term cultivation of human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29: 1656–1662.
- Engelmann K, Drexler D, Böhnke M. 1999b; Transplantation of adult human or porcine corneal endothelial cells onto human recipients in vitro. Part I: Cell culturing and transplantation procedure. *Cornea* 18: 199–206.
- Engelmann K, Friedl P. 1989; Optimization of culture conditions for human corneal endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 25: 1065–1072.
- Engelmann K, Friedl P. 1995; Growth of human corneal endothelial cells in a serum-reduced medium. *Cornea* 14: 62–70.
- Engelmann K, Kotomin I, Knipper A *et al.* 2013; Nahtlose Amnionmembrantransplantation. *Ophthalmologe* 110: 675–680.
- Erb C, Schlote T (Hg.). 2011; Medikamentöse Augentherapie. 5. Aufl. Stuttgart, New York: Thieme.
- Etheredge L, Kane BP, Hassell JR. 2009; The effect of growth factor signaling on keratocytes in vitro and its relationship to the phases of stromal wound repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50: 3128–3136.
- Ethier CR, Johnson M, Ruberti J. 2004; Ocular biomechanics and biotransport. *Annu Rev Biomed Eng* 6: 249–273.
- Fagerholm P, Lagali NS, Merrett K *et al.* 2010; A biosynthetic alternative to human donor tissue for inducing corneal regeneration: 24-month follow-up of a phase 1 clinical study. *Sci Transl Med* 2: 46ra61.
- Fagerholm P, Lagali NS, Ong JA *et al.* 2014; Stable corneal regeneration four years after implantation of a cell-free recombinant human collagen scaffold. *Biomaterials* 35: 2420–2427.
- Fan F, Wood KV. 2007; Bioluminescent assays for high-throughput screening. *Assay Drug Dev Technol* 5: 127–136.
- Farndale RW, Buttle DJ, Barrett AJ. 1986; Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta* 883: 173–177.

- Farndale RW, Sayers CA, Barrett AJ. 1982; A direct spectrophotometric microassay for sulfated glycosaminoglycans in cartilage cultures. *Connect Tissue Res* 9: 247–248.
- Fernandes M, Sridhar MS, Sangwan VS *et al.* 2005; Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Cornea* 24: 643–653.
- Fiers W, Beyaert R, Declercq W *et al.* 1999; More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 18: 7719–7730.
- Finl M. 1999; Keratocyte and fibroblast phenotypes in the repairing cornea. *Prog Retin Eye Res* 18: 529–551.
- Freshney RI. 2005; Culture of animal cells. 5. Aufl. Hoboken, New Jersey: Wiley-Blackwell.
- Freshney RI. 1990; Tierische Zellkulturen. Berlin: De Gruyter.
- Funderburgh JL. 2001; Proteoglycan expression during transforming growth factor beta-induced keratocyte-myofibroblast transdifferentiation. *J Biol Chem* 276: 44173–44178.
- Funderburgh JL, Mann MM, Funderburgh ML. 2003; Keratocyte phenotype mediates proteoglycan structure: a role for fibroblasts in corneal fibrosis. *J Biol Chem* 278: 45629–45637.
- Furthmayr H, Timpl R. 1971; Characterization of collagen peptides by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide electrophoresis. *Anal Biochem* 41: 510–516.
- Galal A, Perez-Santonja JJ, Rodriguez-Prats JL *et al.* 2007; Human anterior lens capsule as a biologic substrate for the ex vivo expansion of limbal stem cells in ocular surface reconstruction. *Cornea* 26: 473–478.
- Gallop PM, Paz MA. 1975; Posttranslational protein modifications, with special attention to collagen and elastin. *Physiol Rev* 55: 418–487.
- Gaunitz F, Heise K. 2003; HTS compatible assay for antioxidative agents using primary cultured hepatocytes. *Assay Drug Dev Technol* 1: 469–477.
- Geesin JC, Darr D, Kaufman R *et al.* 1988; Ascorbic acid specifically increases type I and type III procollagen messenger RNA levels in human skin fibroblast. *J Invest Dermatol* 90: 420–424.
- Geggel HS, Friend J, Thoft RA. 1985; Collagen gel for ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26: 901–905.
- Germain L, Auger FA, Grandbois E *et al.* 1999; Reconstructed human cornea produced in vitro by tissue engineering. *Pathobiology* 67: 140–147.

- Ghiani AA, Grobe GM. 2005; Charakterisierung von Kollagen aus Rattenschwanzsehnen als Matrix für In-vitro-Zellkultursysteme. Wahlpflichtarbeit. TU Braunschweig, Braunschweig. Institut für Pharmazeutische Technologie.
- Giraud-Guille M. 1992; Liquid crystallinity in condensed type I collagen solutions. *J Mol Biol* 224: 861–873.
- Goldman JN, Benedek GB, Dohlman CH *et al.* 1968; Structural alterations affecting transparency in swollen human corneas. *Invest Ophthalmol* 7: 501–519.
- Gonzalez R, Tarloff J. 2001; Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar blue and MTT reductase activity. *Toxicol In Vitro* 15: 257–259.
- Gospodarowicz D, Mescher AL, Birdwell CR. 1977; Stimulation of corneal endothelial cell proliferations in vitro by fibroblast and epidermal growth factors. *Exp Eye Res* 25: 75–89.
- Götze T, Valtink M, Nitschke M *et al.* 2008; Cultivation of an immortalized human corneal endothelial cell population and two distinct clonal subpopulations on thermo-responsive carriers. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 246: 1575–1583.
- Grant MB, Khaw PT, Schultz GS *et al.* 1992; Effects of epidermal growth factor, fibroblast growth factor, and transforming growth factor-beta on corneal cell chemotaxis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 3292–3301.
- Grehn F. 2012; Augenheilkunde. 31. Aufl. Heidelberg: Springer.
- Griffith M, Jackson WB, Lagali N *et al.* 2009; Artificial corneas: a regenerative medicine approach. *Eye* 23: 1985–1989.
- Griffith M, Osborne R, Munger R *et al.* 1999; Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. *Science* 286: 2169–2172.
- Griffith M, Trinkaus-Randall V, Watsky MA *et al.* 2002; Cornea. In: Atala A und Lanza RP (Hg.): Methods of tissue engineering. San Diego: Academic Press: 927–942.
- Griffith M, Watsky MA, Liu C *et al.* 2002; Epithelial cell culture: Cornea. In: Atala A und Lanza RP (Hg.): Methods of tissue engineering. San Diego: Academic Press: 131–140.
- Grimm S. 2003; Die Apoptose: Programmierter Zelltod. *Chem Unserer Zeit* 37: 172–178.
- Grinnell F, Fukamizu H, Pawelek P *et al.* 1989; Collagen processing, crosslinking, and fibril bundle assembly in matrix produced by fibroblasts in long-term cultures supplemented with ascorbic acid. *Exp Cell Res* 181: 483–491.

- Guillemette MD, Cui B, Roy E *et al.* 2009; Surface topography induces 3D self-orientation of cells and extracellular matrix resulting in improved tissue function. *Integr Biol* 1: 196–204.
- Gunkel C. 1994; Kollagenmikropartikel: Charakterisierungs- und Herstellungsmethoden. Dissertation. Philipps-Universität, Marburg/Lahn. Fachbereich Chemie und Lebensmittelchemie.
- Guo X, Hutcheon AEK, Melotti SA *et al.* 2007; Morphologic characterization of organized extracellular matrix deposition by ascorbic acid stimulated human corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 4050–4060.
- Gütt S. 1998; Rheologische in vivo-Untersuchung an der menschlichen Haut mit nicht-invasiven Verfahren. Dissertation. Universität Hamburg, Hamburg. Institut für Gewerblich Technische Wissenschaften.
- Hahn A, Thanos M, Reinhard T *et al.* 2010; Arbeitsrichtlinien. Gute fachliche Praxis zur Gewinnung und Herstellung von kryokonservierter humaner Amnionmembran aus Spenderplazenta. *Ophthalmologe* 107: 1020–1031.
- Hahne M, Reichl S. 2011; Development of a serum-free human cornea construct for in vitro drug absorption studies: the influence of varying cultivation parameters on barrier characteristics. *Int J Pharm* 416: 268–279.
- Hahne M, Zorn-Kruppa M, Guzman G *et al.* 2012; Prevalidation of a human cornea construct as an alternative to animal corneas for in vitro drug absorption studies. *J Pharm Sci* 101: 2976–2988.
- Hamilton KE, Pye DC. 2008; Young's modulus in normal corneas and the effect on applanation tonometry. *Optom Vis Sci* 85: 445–450.
- Hamrah P, Eiferman RA. 2010; Corneal trauma and burns. In: Trattler B, Majmudar PA, Luchs JI *et al.* (Hg.): Cornea handbook. Thorofare, NJ: SLACK Inc.: 191–200.
- Han B, Schwab IR, Madsen TK *et al.* 2002; A fibrin-based bioengineered ocular surface with human corneal epithelial stem cells. *Cornea* 21: 505–510.
- Härtel S, Zorn-Kruppa M, Tykhonova S *et al.* 2003; Staurosporine-induced apoptosis in human cornea epithelial cells in vitro. *Cytometry* 55: 15–23.
- Hassell JR, Birk DE. 2010; The molecular basis of corneal transparency. *Exp Eye Res* 91: 326–335.
- Hassell JR, Schrecengost PK, Rada JA *et al.* 1992; Biosynthesis of stromal matrix proteoglycans and basement membrane components by human corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol* 33: 547–557.

- Hata R, Senoo H. 1989; L-ascorbic acid 2-phosphate stimulates collagen accumulation, cell proliferation, and formation of a three-dimensional tissuelike substance by skin fibroblasts. *J Cell Physiol* 138: 8–16.
- Hayashi T, Nagai Y. 1980; The anomalous behavior of collagen peptides on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis is due to the low content of hydrophobic amino acid residues. *J Biochem* 87: 803–808.
- Hickey TE, Majam G, Guerry P. 2005; Intracellular survival of campylobacter jejuni in human monocytic cells and induction of apoptotic death by cytholethal distending toxin. *Infect Immun* 73: 5194–5197.
- Higa K, Takeshima N, Moro F *et al.* 2011; Porous silk fibroin film as a transparent carrier for cultivated corneal epithelial sheets. *J Biomater Sci, Polym Ed* 22: 2261–2276.
- Höffeler F. 2004; Die Maschinerie der Apoptose: Chronik eines angekündigten Todes. *Biol Unserer Zeit* 34: 16–23.
- Hollenberg MD, Cuatrecasas P. 1973; Epidermal growth factor: receptors in human fibroblasts and modulation of action by cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 2964–2968.
- Hornof M, Toropainen E, Urtti A. 2005; Cell culture models of the ocular barriers. *Eur J Pharm Biopharm* 60: 207–225.
- Hug H. 2000; Apoptose: Die Selbstvernichtung der Zelle als Überlebensschutz. *Biol Unserer Zeit* 30: 128–135.
- Hulmes DJ. 2008; Collagen diversity, synthesis and assembly. In: Fratzl P (Hg.): Collagen. Structure and mechanics. New York: Springer: 15–48.
- Hussain SH, Limthongkul B, Humphreys TR. 2013; The biomechanical properties of the skin. *Dermatol Surg* 39: 193–203.
- Ide T, Nishida K, Yamato M *et al.* 2006; Structural characterization of bioengineered human corneal endothelial cell sheets fabricated on temperature-responsive culture dishes. *Biomaterials* 27: 607–614.
- Idziorek T, Estaquier J, de Bels F *et al.* 1995; YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. *J Immunol Methods* 185: 249–258.
- Ijiri S, Kobayashi A, Yoshita T *et al.* 2007; Measurement of light transmission of human limbal epithelial cells cultured on human amniotic membranes. *Cornea* 26: 348–351.

- Iozzo RV. 1998; Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 67: 609–652.
- Ishino Y, Sano Y, Nakamura T *et al.* 2004; Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 800–806.
- Jester JV, Barry-Lane PA, Cavanagh HD *et al.* 1996; Induction of alpha-smooth muscle actin expression and myofibroblast transformation in cultured corneal keratocytes. *Cornea* 15: 505–516.
- Jester JV, Moller-Pedersen T, Huang J *et al.* 1999; The cellular basis of corneal transparency: evidence for 'corneal crystallins'. *J Cell Sci* 112 (Pt 5): 613–622.
- Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. 1979a; A simple and sensitive method for the quantitative estimation of collagen. *Anal Biochem* 94: 96–99.
- Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. 1979b; Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 11: 447–455.
- Kahn CR, Young E, Lee IH *et al.* 1993; Human corneal epithelial primary cultures and cell lines with extended life span: in vitro model for ocular studies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 3429–3441.
- Kanduc D, Mittelman A, Serpico R *et al.* 2002; Cell death: apoptosis versus necrosis. *Int J Oncol* 21: 165–170.
- Kanski JJ. 1996; Lehrbuch der klinischen Ophthalmologie. 2. Aufl. Stuttgart, New York: Thieme.
- Karamichos D, Guo XQ, Hutcheon AEK *et al.* 2010; Human corneal fibrosis: an in vitro model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51: 1382–1388.
- Karamichos D, Lakshman N, Petroll WM. 2007; Regulation of corneal fibroblast morphology and collagen reorganization by extracellular matrix mechanical properties. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 5030–5037.
- Kjellén L, Lindahl U. 1991; Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem* 60: 443–475.
- Köhler W, Eggers HJ, Fleischer B *et al.* (Hg.). 2001; Medizinische Mikrobiologie. 8. Aufl. München, Jena: Urban & Fischer.
- Kohlhaas M. 2008; Kollagen-Crosslinking mit Riboflavin und UVA-Licht beim Keratokonus. *Ophthalmologe* 105: 785–796.
- Koo S, Ahn SJ, Zhang H *et al.* 2011; Human corneal keratocyte response to micro- and nano-gratings on chitosan and PDMS. *Cell Mol Bioeng* 4: 399–410.

- Kruse FE, Cursiefen C. 2008; Surgery of the cornea: corneal, limbal stem cell and amniotic membrane transplantation. *Dev Ophthalmol* 41: 159–170.
- Kruse FE, Meller D. 2001; Die Amnionmembrantransplantation zur Rekonstruktion der Augenoberfläche. *Ophthalmologe* 98: 801–810.
- Kumano Y, Sakamoto T, Egawa M *et al.* 1998; Enhancing effect of 2-O-alpha-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid, a stable ascorbic acid derivative, on collagen synthesis. *Biol Pharm Bull* 21: 662–666.
- Kunsch K, Kunsch S. 2005; Der Mensch in Zahlen. Genehmigte Sonderausg. Erftstadt, Heidelberg: Area; Spektrum, Akad. Verl.
- Laemmli UK. 1970; Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- Lagali N, Fagerholm P, Griffith M. 2011; Biosynthetic corneas: prospects for supplementing the human donor cornea supply. *Exp Rev Med Devic* 8: 127–130.
- Lagali N, Griffith M, Fagerholm P *et al.* 2008; Innervation of tissue-engineered recombinant human collagen-based corneal substitutes: a comparative in vivo confocal microscopy study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49: 3895–3902.
- Lai J, Li Y, Cho C *et al.* 2012; Nanoscale modification of porous gelatin scaffolds with chondroitin sulfate for corneal stromal tissue engineering. *Int J Nanomedicine* 7: 1101–1114.
- Lanza RP, Langer RS, Vacanti J (Hg.). 2007; Principles of tissue engineering. 3. Aufl. Burlington, MA: Elsevier Academic Press.
- Lawrence BD, Marchant JK, Pindrus MA *et al.* 2009; Silk film biomaterials for cornea tissue engineering. *Biomaterials* 30: 1299–1308.
- Leist M, Nicotera P. 1997; The shape of cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 236: 1–9.
- Levene CI, Bates CJ. 1975; Ascorbic acid and collagen synthesis in cultured fibroblasts. *Ann N Y Acad Sci* 258: 288–306.
- Levis HJ, Brown RA, Daniels JT. 2010; Plastic compressed collagen as a biomimetic substrate for human limbal epithelial cell culture. *Biomaterials* 31: 7726–7737.
- Levis HJ, Menzel-Severing J, Drake RAL *et al.* 2013; Plastic compressed collagen constructs for ocular cell culture and transplantation: a new and improved technique of confined fluid loss. *Curr Eye Res* 38: 41–52.



- Levis HJ, Peh, Gary S. L., Toh K *et al.* 2012; Plastic Compressed Collagen as a Novel Carrier for Expanded Human Corneal Endothelial Cells for Transplantation. *PLoS ONE* 7: e50993.
- Lewis MS, Piez KA. 1964; Sedimentation-equilibrium studies of the molecular weight of single and double chains from rat-skin collagen. *Biochemistry* 3: 1126–1131.
- L'Heureux N, Pâquet S, Labbé R *et al.* 1998; A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J* 12: 47–56.
- Li F, Carlsson D, Lohmann C *et al.* 2003; Cellular and nerve regeneration within a biosynthetic extracellular matrix for corneal transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 15346–15351.
- Li F, Griffith M, Li Z *et al.* 2005; Recruitment of multiple cell lines by collagen-synthetic copolymer matrices in corneal regeneration. *Biomaterials* 26: 3093–3104.
- Lindl T. 1994; Zell- und Gewebekultur. 3. Aufl. Stuttgart, New York: Gustav Fischer.
- Liu J, Lawrence BD, Liu A *et al.* 2012b; Silk fibroin as a biomaterial substrate for corneal epithelial cell sheet generation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53: 4130–4138.
- Liu W, Deng C, McLaughlin CR *et al.* 2009; Collagen–phosphorylcholine interpenetrating network hydrogels as corneal substitutes. *Biomaterials* 30: 1551–1559.
- Liu W, Merrett K, Griffith M *et al.* 2008; Recombinant human collagen for tissue engineered corneal substitutes. *Biomaterials* 29: 1147–1158.
- Liu Y, Gan L, Carlsson DJ *et al.* 2006a; A simple, cross-linked collagen tissue substitute for corneal implantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47: 1869–1875.
- Liu Y, Griffith M, Watsky MA *et al.* 2006b; Properties of porcine and recombinant human collagen matrices for optically clear tissue engineering applications. *Biomacromolecules* 7: 1819–1828.
- Liu Y, Ren L, Wang Y. 2013; Crosslinked collagen–gelatin–hyaluronic acid biomimetic film for cornea tissue engineering applications. *Mater Sci Eng C* 33: 196–201.
- Liu Y, Ren L, Yao H *et al.* 2012a; Collagen films with suitable physical properties and biocompatibility for corneal tissue engineering prepared by ion leaching technique. *Mater Lett* 87: 1–4.
- Lynch AP, Ahearne M. 2013; Strategies for developing decellularized corneal scaffolds. *Exp Eye Res* 108: 42–47.
- Ma DH, Lai J, Cheng H *et al.* 2010; Carbodiimide cross-linked amniotic membranes for cultivation of limbal epithelial cells. *Biomaterials* 31: 6647–6658.
- Maehara Y, Anai H, Tamada R *et al.* 1987; The ATP assay is more sensitive than the succinate dehydrogenase inhibition test for predicting cell viability. *Eur J Cancer Clin Oncol* 23: 273–276.

- Maier P, Reinhard T. 2013; Riboflavin/UVA-Crosslinking beim Keratokonus. *Ophthalmologe* 110: 818–822.
- Manzer AK, Lombardi-Borgia S, Schäfer-Korting M *et al.* 2009; SV40-transformed human corneal keratocytes: optimisation of serum-free culture conditions. *ALTEX-Altern Tierexp* 26: 33–39.
- Martin AN, Leuenberger H. 2002; Physikalische Pharmazie. 4. Aufl. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Maurice D. 1957; The structure and transparency of the cornea. *J Physiol* 136: 263–286.
- McLaughlin CR, Acosta MC, Luna C *et al.* 2010; Regeneration of functional nerves within full thickness collagen–phosphorylcholine corneal substitute implants in guinea pigs. *Biomaterials* 31: 2770–2778.
- Meek KM. 2008; The cornea and sclera. In: Fratzl P (Hg.): Collagen. Structure and mechanics. New York: Springer: 359–396.
- Meek KM, Boote C. 2004; The organization of collagen in the corneal stroma. *Exp Eye Res* 78: 503–512.
- Meek KM, Leonard DW, Connon CJ *et al.* 2003; Transparency, swelling and scarring in the corneal stroma. *Eye* 17: 927–936.
- Meller D, Pauklin M, Thomasen H *et al.* 2011; Amnionmembrantransplantation am menschlichen Auge. *Dtsch Arztebl Int* 108: 243–248.
- Meller D, Thomasen H, Steuhl K. 2012; Oberflächenrekonstruktion bei Limbusstammzellinsuffizienz. *Ophthalmologe* 109: 863–868.
- Merrett K, Fagerholm P, McLaughlin CR *et al.* 2008; Tissue-engineered recombinant human collagen-based corneal substitutes for implantation: performance of type I versus type III collagen. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49: 3887–3894.
- Mezger T. 2000; Das Rheologie-Handbuch. Hannover: Vincentz.
- Mi S, Chen B, Wright B *et al.* 2010; Plastic compression of a collagen gel forms a much improved scaffold for ocular surface tissue engineering over conventional collagen gels. *J Biomed Mater Res A* 95: 447–453.
- Michel M, L'Heureux N, Pouliot R *et al.* 1999; Characterization of a new tissue-engineered human skin equivalent with hair. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 35: 318–326.
- Mimura T, Yamagami S, Amano S. 2013; Corneal endothelial regeneration and tissue engineering. *Prog Retin Eye Res* 35: 1–17.

- Minami Y, Sugihara H, Oono S. 1993; Reconstruction of cornea in three-dimensional collagen gel matrix culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 2316–2324.
- Mosmann T. 1983; Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55–63.
- Mueller A. 2008; Neues aus der Ophthalmologie. *Bayrisches Ärzteblatt*: 672–676.
- Musselmann K, Alexandrou B, Kane B *et al.* 2005; Maintenance of the keratocyte phenotype during cell proliferation stimulated by insulin. *J Biol Chem* 280: 32634–32639.
- Musselmann K, Kane B, Alexandrou B *et al.* 2006; Stimulation of collagen synthesis by insulin and proteoglycan accumulation by ascorbate in bovine keratocytes in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47: 5260–5266.
- Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK *et al.* 2008; Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 9. Aufl. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Naeser P. 1997; Insulin receptors in human ocular tissues. Immunohistochemical demonstration in normal and diabetic eyes. *Ups J Med Sci* 102: 35–40.
- Nakamura K, Inoue S, Abiko S *et al.* 1989; Improved separation of alpha chains of collagen type I, type III, and type V by noninterrupted electrophoresis using thioglycolic acid as a negatively charged reducer. *Electrophoresis* 10: 29–33.
- Newsome DA, Takasugi M, Kenyon KR *et al.* 1974; Human corneal cells in vitro: morphology and histocompatibility (HL-A) antigens of pure cell populations. *Invest Ophthalmol* 13: 23–32.
- Nishida K. 2003; Tissue engineering of the cornea. *Cornea* 22: S28-34.
- Nishida K, Yamato M, Hayashida Y *et al.* 2004; Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation* 77: 379–385.
- Nishida T, Ueda A, Fukuda M *et al.* 1988; Interactions of extracellular collagen and corneal fibroblasts: Morphologic and biochemical changes of rabbit corneal cells cultured in a collagen matrix. *In Vitro Cell Dev Biol* 24: 1009–1014.
- Nitschke M, Gramm S, Götze T *et al.* 2007; Thermo-responsive poly(NiPAAm-co-DEGMA) substrates for gentle harvest of human corneal endothelial cell sheets. *J Biomed Mater Res A* 80: 1003–1010.
- O'Brien J, Wilson I, Orton T *et al.* 2000; Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 267: 5421–5426.

- O'Brien MC, Healy SF, Raney SR *et al.* 1997; Discrimination of late apoptotic/necrotic cells (type III) by flow cytometry in solid tumors. *Cytometry* 28: 81–89.
- Oh SP, Griffith CM, Hay ED *et al.* 1993; Tissue-specific expression of type XII collagen during mouse embryonic development. *Dev Dyn* 196: 37–46.
- Ohji M, SundarRaj N, Hassell JR *et al.* 1994; Basement membrane synthesis by human corneal epithelial cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 479–485.
- Orwin EJ, Borene ML, Hubel A. 2003; Biomechanical and optical characteristics of a corneal stromal equivalent. *J Biomech Eng* 125: 439.
- Orwin EJ, Hubel A. 2000; In vitro culture characteristics of corneal epithelial, endothelial, and keratocyte cells in a native collagen matrix. *Tissue Eng* 6: 307–319.
- Paulsen F, Waschke J (Hg.). 2010; Sobotta - Atlas der Anatomie des Menschen. 23. Aufl. München: Elsevier, Urban & Fischer.
- Peterkofsky B. 1972; The effect of ascorbic acid on collagen polypeptide synthesis and proline hydroxylation during the growth of cultured fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 152: 318–328.
- Petty RD, Sutherland LA, Hunter EM *et al.* 1995; Comparison of MTT and ATP-based assays for the measurement of viable cell number. *J Biolumin Chemilumin* 10: 29–34.
- Pieramici S, Afshari N, Luchs JI. 2010; Corneal dystrophies. In: Trattler B, Majmudar PA, Luchs JI *et al.* (Hg.): Cornea handbook. Thorofare, NJ: SLACK Inc.: 75–108.
- Promega Corporation. 2011; Protocols & applications guide, Chapter 8: Bioluminescent Reporters. *Promega Corporation, USA-Madison.*
- Promega Corporation. 2005; Technical bulletin Caspase-Glo 3/7 assay. *Promega Corporation, USA-Madison.*
- Promega Corporation. 2007a; Technical bulletin Caspase-Glo 8 assay. *Promega Corporation, USA-Madison.*
- Promega Corporation. 2008b; Technical bulletin Caspase-Glo 9 assay. *Promega Corporation, USA-Madison.*
- Promega Corporation. 2009; Technical bulletin CellTiter-Fluor viability assay. *Promega Corporation, USA-Madison.*
- Promega Corporation. 2008a; Technical bulletin CellTiter-Glo luminescent cell viability assay. *Promega Corporation, USA-Madison.*

- Promega Corporation. 2013; Technical bulletin CytoTox-Glo cytotoxicity assay. *Promega Corporation, USA-Madison*.
- Promega Corporation. 2007b; Technical bulletin CytoTox-ONE homogeneous membrane integrity assay. *Promega Corporation, USA-Madison*.
- Proulx S, d'Arc Uwamaliya J, Carrier P *et al*. 2010; Reconstruction of a human cornea by the self-assembly approach of tissue engineering using the three native cell types. *Mol Vis* 16: 2192–2201.
- Rada JA, Cornuet PK, Hassell JR. 1993; Regulation of corneal collagen fibrillogenesis in vitro by corneal proteoglycan (lumican and decorin) core proteins. *Exp Eye Res* 56: 635–648.
- Radda TM, Menzel EJ, Freyler H *et al*. 1982; Collagen types in keratoconus. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 218: 262–264.
- Raiskup F, Spörl E. 2013a; Corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet A. I. Principles. *Ocul Surf* 11: 65–74.
- Raiskup F, Spörl E. 2013b; Corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet A. Part II. Clinical indications and results. *Ocul Surf* 11: 93–108.
- Rama P, Bonini S, Lambiase A *et al*. 2001; Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation* 72: 1478–1485.
- Rama P, Matuska S, Paganoni G *et al*. 2010; Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N Engl J Med* 363: 147–155.
- Raviv T. 2010; Anatomy and physiology of the cornea. In: Trattler B, Majmudar PA, Luchs JI *et al*. (Hg.): Cornea handbook. Thorofare, NJ: SLACK Inc.: 1–12.
- Rehm H, Hammar F. 2005; Biochemie light. 3., korrigierte Aufl. Frankfurt am Main: Deutsch.
- Reichl S. 2008; Cell culture models of the human cornea - a comparative evaluation of their usefulness to determine ocular drug absorption in-vitro. *J Pharm Pharmacol* 60: 299–307.
- Reichl S. 2003; Entwicklung porciner und humaner organotypischer cornealer Zellkulturmodelle für in vitro Permeationsuntersuchungen. Dissertation. TU Braunschweig, Braunschweig. Institut für Pharmazeutische Technologie.
- Reichl S. 2009; Films based on human hair keratin as substrates for cell culture and tissue engineering. *Biomaterials* 30: 6854–6866.

- Reichl S, Bednarz J, Müller-Goymann CC. 2004; Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies. *Br J Ophthalmol* 88: 560–565.
- Reichl S, Borrelli M, Geerling G. 2011; Keratin films for ocular surface reconstruction. *Biomaterials* 32: 3375–3386.
- Reichl S, Döhring S, Bednarz J *et al.* 2005; Human cornea construct HCC-an alternative for in vitro permeation studies? A comparison with human donor corneas. *Eur J Pharm Biopharm* 60: 305–308.
- Reichl S, Müller-Goymann CC. 2001; Entwicklung eines organotypischen Korneakonstruktes als ein In-vitro-Modell für Permeationsstudien. *Ophthalmologe* 98: 853–858.
- Reichl S, Müller-Goymann CC. 2003; The use of a porcine organotypic cornea construct for permeation studies from formulations containing beximolol hydrochloride. *Int J Pharm* 250: 191–201.
- Ren R, Hutcheon AEK, Guo XQ *et al.* 2008; Human primary corneal fibroblasts synthesize and deposit proteoglycans in long-term 3-D cultures. *Dev Dyn* 237: 2705–2715.
- Rieck PW, Pleyer U. 2003; Wundheilung der Hornhaut, Teil II: Therapie von Wundheilungsstörungen. *Ophthalmologe* 100: 1109–1130.
- Rieck PW, Sherif ZA, Pleyer U *et al.* 2003; Wundheilung der Hornhaut, Teil I: Biologische Grundlagen und ihre klinische Relevanz. *Ophthalmologe* 100: 749–770.
- Rocha EM, Cunha DA, Carneiro EM *et al.* 2002; Identification of insulin in the tear film and insulin receptor and IGF-1 receptor on the human ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 963–967.
- Romeis B. 2010; Romeis Mikroskopische Technik. 18. Aufl. München: Urban & Fischer.
- Ruberti JW, Zieske JD, Trinkaus-Randall V. 2007; Corneal-tissue replacement. In: Lanza RP, Langer RS und Vacanti J (Hg.): Principles of tissue engineering. 3. Aufl. Burlington, MA: Elsevier Academic Press: 1025–1047.
- Ruberti JW, Zieske JD. 2008; Prelude to corneal tissue engineering - gaining control of collagen organization. *Prog Retin Eye Res* 27: 549–577.
- Ruggiero F, Burillon C, Garrone R. 1996; Human corneal fibrillogenesis. Collagen V structural analysis and fibrillar assembly by stromal fibroblasts in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 1749–1760.

- Russell SB, Russell JD, Trupin KM. 1981; Collagen synthesis in human fibroblasts: effects of ascorbic acid and regulation by hydrocortisone. *J Cell Physiol* 109: 121–131.
- Russell WM, Burch RL. 1959; The principles of humane experimental technique. London: Methuen.
- Saika S. 1992; Ultrastructural effect of L-ascorbic acid 2-phosphate on cultured keratocytes. *Cornea* 11: 439–445.
- Saika S, Uenoyama K, Hiroi K *et al.* 1992; L-ascorbic acid 2-phosphate enhances the production of type I and type III collagen peptides in cultured rabbit keratocytes. *Ophthalmic Res* 24: 68–72.
- Sakai M, Imai Teruko, Ohtake H *et al.* 1998; Biopharmaceutics: Cytotoxicity of absorption enhancers in Caco-2 cell monolayers. *J Pharm Pharmacol* 50: 1101–1108.
- Santos NC, Figueira-Coelho J, Martins-Silva J *et al.* 2003; Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem Pharmacol* 65: 1035–1041.
- Schmut O. 1978; The organization of tissues of the eye by different collagen types. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* 207: 189–199.
- Schneider AI, Maier-Reif K, Graeve T. 1997; The use of an in vitro cornea for predicting ocular toxicity. *In Vitro Toxicol* 10: 309–318.
- Schneider AI, Maier-Reif K, Graeve T. 1999; Constructing an in vitro cornea from cultures of the three specific corneal cell types. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 35: 515–526.
- Schultz G, Chegini N, Grant M *et al.* 1992a; Effects of growth factors on corneal wound healing. *Acta Ophthalmol Suppl*: 60–66.
- Schultz G, Cipolla L, Whitehouse A *et al.* 1992b; Growth factors and corneal endothelial cells: III. Stimulation of adult human corneal endothelial cell mitosis in vitro by defined mitogenic agents. *Cornea* 11: 20–27.
- Schultz G, Khaw PT, Oxford K *et al.* 1994; Growth factors and ocular wound healing. *Eye* 8 (Pt 2): 184–187.
- Schwartz E, Bienkowski RS, Coltoff-Schiller B *et al.* 1982; Changes in the components of extracellular matrix and in growth properties of cultured aortic smooth muscle cells upon ascorbate feeding. *J Cell Biol* 92: 462–470.
- Scott JE. 1991; Proteoglycan:collagen interactions in connective tissues. Ultrastructural, biochemical, functional and evolutionary aspects. *Int J Biol Macromol* 13: 157–161.

- Scott JE, Haigh M. 1988; Identification of specific binding sites for keratan sulphate proteoglycans and chondroitin-dermatan sulphate proteoglycans on collagen fibrils in cornea by the use of cupromeronic blue in 'critical-electrolyte-concentration' techniques. *Biochem J* 253: 607–610.
- Seeber JW, Zorn-Kruppa M, Lombardi-Borgia S *et al.* 2008; Characterisation of human corneal epithelial cell cultures maintained under serum-free conditions. *Altern Lab Anim* 36: 569–583.
- Shimmura S, Doillon CJ, Griffith M *et al.* 2003; Collagen-poly(N-isopropylacrylamide)-based membranes for corneal stroma scaffolds. *Cornea* 22: S81-8.
- Slater TF, Sawyer B, Straeuli U. 1963; Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim Biophys Acta* 77: 383–393.
- Speckmann E, Wittkowski W. 2000; Bau und Funktionen des menschlichen Körpers. 19. Aufl. München: Urban und Schwarzenberg.
- Spörl E, Huhle M, Kasper M *et al.* 1997; Erhöhung der Festigkeit der Hornhaut durch Vernetzung. *Ophthalmologe* 94: 902–906.
- Spörl E, Mrochen M, Sliney D *et al.* 2007; Safety of UVA-riboflavin cross-linking of the cornea. *Cornea* 26: 385–389.
- Spörl E, Raiskup-Wolf F, Pillunat L. 2008; Biophysikalische Grundlagen der Kollagenvernetzung. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 225: 131–137.
- Spörl E, Schreiber J, Hellmund K *et al.* 2000; Untersuchungen zur Verfestigung der Hornhaut am Kaninchen. *Ophthalmologe* 97: 203–206.
- Stephan H, Polzar B, Mannherz HG. 2000; Sein oder nicht sein?. *Nat Wiss Rundsch* 53: 273–281.
- Stieß M. 1994; Mechanische Verfahrenstechnik 2. 1. Aufl. Berlin: Springer.
- Stocker FW, Eiring A, Georgiade R *et al.* 1958; A tissue culture technique for growing corneal epithelial, stromal, and endothelial tissues separately. *Am J Ophthalmol* 46: 294–298.
- Stoesser TR, Church RL, Brown SI. 1978; Partial characterization of human collagen and procollagen secreted by human corneal stromal fibroblasts in cell culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17: 264–271.
- Stryer L. 1996; Biochemie. 4. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Sumide T, Nishida K, Yamato M *et al.* 2006; Functional human corneal endothelial cell sheets harvested from temperature-responsive culture surfaces. *FASEB J* 20: 392–394.
- Suuronen EJ, McLaughlin CR, Stys PK *et al.* 2004; Functional innervation in tissue engineered models for in vitro study and testing purposes. *Toxicol Sci* 82: 525–533.



- Sykes B, Puddle B, Francis M *et al.* 1976; The estimation of two collagens from human dermis by interrupted gel electrophoresis. *Biochem Biophys Res Commun* 72: 1472–1480.
- Talbot M, Carrier P, Giasson CJ *et al.* 2006; Autologous transplantation of rabbit limbal epithelia cultured on fibrin gels for ocular surface reconstruction. *Mol Vis* 12: 65–75.
- Taylor-Papadimitriou J, Purkis P, Fentiman IS. 1980; Cholera toxin and analogues of cyclic AMP stimulate the growth of cultured human mammary epithelial cells. *J Cell Physiol* 102: 317–321.
- Tegtmeyer S. 2000; Kultivierung und Charakterisierung von bovinen in vitro Cornea-Modellen für Permeationsuntersuchungen. Dissertation. TU Braunschweig, Braunschweig. Institut für Pharmazeutische Technologie.
- Tegtmeyer S, Papantoniou I, Müller-Goymann CC. 2001; Reconstruction of an in vitro cornea and its use for drug permeation studies from different formulations containing pilocarpine hydrochloride. *Eur J Pharm Biopharm* 51: 119–125.
- Tegtmeyer S, Reichl S, Müller-Goymann CC. 2004; Cultivation and characterization of a bovine in vitro model of the cornea. *Pharmazie* 59: 464–471.
- Teichmann J, Valtink M, Gramm S *et al.* 2013; Human corneal endothelial cell sheets for transplantation: thermo-responsive cell culture carriers to meet cell-specific requirements. *Acta Biomater* 9: 5031–5039.
- Thews G, Vaupel P, Mutschler E. 1999; Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Menschen. 5. Aufl. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Thompson RE, Boraas LC, Sowder M *et al.* 2013; Three-dimensional cell culture environment promotes partial recovery of the native corneal keratocyte phenotype from a subcultured population. *Tissue Eng Part A* 19: 1564–1572.
- Thuret G, Chiquet C, Herrag S *et al.* 2003; Mechanisms of staurosporine induced apoptosis in a human corneal endothelial cell line. *Br J Ophthalmol* 87: 346–352.
- Toropainen E, Ranta VP, Talvitie A *et al.* 2001; Culture model of human corneal epithelium for prediction of ocular drug absorption. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 2942–2948.
- Toropainen E, Ranta VP, Vellonen KS *et al.* 2003; Paracellular and passive transcellular permeability in immortalized human corneal epithelial cell culture model. *Eur J Pharm Sci* 20: 99–106.
- Tseng SC, Prabhasawat P, Barton K *et al.* 1998; Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol* 116: 431–441.

- Tullberg-Reinert H, Jundt G. 1999; In situ measurement of collagen synthesis by human bone cells with a sirius red-based colorimetric microassay: effects of transforming growth factor beta2 and ascorbic acid 2-phosphate. *Histochem Cell Biol* 112: 271–276.
- Umemoto T, Yamato M, Nishida K *et al.* 2013; Regenerative medicine of cornea by cell sheet engineering using temperature-responsive culture surfaces. *Chin Sci Bull* 58: 4349–4356.
- Valtink M, Gruschwitz R, Funk RH *et al.* 2008; Two clonal cell lines of immortalized human corneal endothelial cells show either differentiated or precursor cell characteristics. *Cells Tissues Organs* 187: 286–294.
- Vogel W, Berke A. 1998; Okuläre Pharmakologie. Stuttgart: Enke.
- Voigt R, Fahr A. 2006; Pharmazeutische Technologie. 10. Aufl. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag.
- Wachtler F (Hg.). 2005; Histologie: Lehrbuch der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen. 7. Aufl. Wien: Facultas.
- Walsh BJ, Thornton SC, Penny R *et al.* 1992; Microplate reader-based quantitation of collagens. *Anal Biochem* 203: 187–190.
- Wang F. 2008; UVA/riboflavin-induced apoptosis in mouse cornea. *Ophthalmologica* 222: 369–372.
- Wang JH, Jia F, Gilbert TW *et al.* 2003; Cell orientation determines the alignment of cell-produced collagenous matrix. *J Biomech* 36: 97–102.
- Weber C. 2009; Evaluation wundheilungsfördernder Therapieoptionen durch In-vitro-Prüfung an Zellkulturmodellen. Dissertation. TU Braunschweig, Braunschweig. Institut für Pharmazeutische Technologie.
- West-Mays JA, Dwivedi DJ. 2006; The keratocyte: corneal stromal cell with variable repair phenotypes. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 1625–1631.
- Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP. 2001; Corneal blindness: a global perspective. *Bull World Health Organ* 79: 214–221.
- Wilson SE, He YG, Weng J *et al.* 1994; Effect of epidermal growth factor, hepatocyte growth factor, and keratinocyte growth factor, on proliferation, motility and differentiation of human corneal epithelial cells. *Exp Eye Res* 59: 665–678.
- Wilson SE, Lloyd SA, He YG *et al.* 1993; Extended life of human corneal endothelial cells transfected with the SV40 large T antigen. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 2112–2123.
- Wollensak G, Redl B. 2008; Gel electrophoretic analysis of corneal collagen after photodynamic cross-linking treatment. *Cornea* 27: 353–356.

- Wollensak G, Spörl E, Reber F *et al.* 2003e; Corneal endothelial cytotoxicity of riboflavin/UVA treatment in vitro. *Ophthalmic Res* 35: 324–328.
- Wollensak G, Spörl E, Reber F *et al.* 2004a; Keratocyte cytotoxicity of riboflavin/UVA-treatment in vitro. *Eye* 18: 718–722.
- Wollensak G, Spörl E, Seiler T. 2003b; Behandlung von Keratokonus durch Kollagenvernetzung. *Ophthalmologe* 100: 44–49.
- Wollensak G, Spörl E, Seiler T. 2003a; Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol* 135: 620–627.
- Wollensak G, Spörl E, Seiler T. 2003d; Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin–ultraviolet-A-induced cross-linking. *J Cataract Refract Surg* 29: 1780–1785.
- Wollensak G, Spörl E, Wilsch M *et al.* 2003c; Endothelial cell damage after riboflavin–ultraviolet-A treatment in the rabbit. *J Cataract Refract Surg* 29: 1786–1790.
- Wollensak G, Spörl E, Wilsch M *et al.* 2004b; Keratocyte apoptosis after corneal collagen cross-linking using riboflavin/UVA treatment. *Cornea* 23: 43–49.
- Woost PG, Jumblatt MM, Eiferman RA *et al.* 1992a; Growth factors and corneal endothelial cells: I. Stimulation of bovine corneal endothelial cell DNA synthesis by defined growth factors. *Cornea* 11: 1–10.
- Woost PG, Jumblatt MM, Eiferman RA *et al.* 1992b; Growth factors and corneal endothelial cells: II. Characterization of epidermal growth factor receptor from bovine corneal endothelial cells. *Cornea* 11: 11–19.
- Wu J, Du Y, Watkins SC *et al.* 2012; The engineering of organized human corneal tissue through the spatial guidance of corneal stromal stem cells. *Biomaterials* 33: 1343–1352.
- Xiao X, Pan S, Liu X *et al.* 2014; In vivo study of the biocompatibility of a novel compressed collagen hydrogel scaffold for artificial corneas. *J Biomed Mater Res A* 102: 1782–1787.
- Yamamoto I, Muto N, Murakami K *et al.* 1992; Collagen synthesis in human skin fibroblasts is stimulated by a stable form of ascorbate, 2-O-alpha-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid. *J Nutr* 122: 871–877.
- Yanai R, Yamada N, Inui M *et al.* 2006; Correlation of proliferative and anti-apoptotic effects of HGF, insulin, IGF-1, IGF-2, and EGF in SV40-transformed human corneal epithelial cells. *Exp Eye Res* 83: 76–83.

- Yanai R, Yamada N, Kugimiya N *et al.* 2002; Mitogenic and antiapoptotic effects of various growth factors on human corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 2122–2126.
- Zieske JD, Mason VS, Wasson ME *et al.* 1994; Basement membrane assembly and differentiation of cultured corneal cells: importance of culture environment and endothelial cell interaction. *Exp Cell Res* 214: 621–633.
- Zorn-Kruppa M, Tykhonova S, Belge G *et al.* 2005; A human corneal equivalent constructed from SV40-immortalised corneal cell lines. *Altern Lab Anim* 33: 37–45.